

Université de Montréal

Interaction entre le GM-CSF et PU.1 dans la survie des précurseurs
myéloïdes

Par

Marianne St-Denis

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)

en Biologie Moléculaire

Avril 2005

© Marianne St-Denis, 2005



QH

506

U54

2005

v.029

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Interaction entre le GM-CSF et PU.1 dans la survie des précurseurs
myéloïdes

Présenté par :

Marianne St-Denis

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Éric Milot

Directrice de recherche : Trang Hoang

Membre du jury : Nathalie Labrecque

Mémoire accepté le :

RÉSUMÉ

Le tissu hématopoïétique est composé de plusieurs types de cellules matures dérivées d'une seule cellule, la cellule souche hématopoïétique. Les facteurs qui déterminent l'orientation de la cellule immature peuvent être classés en deux grandes catégories : les facteurs intrinsèques (facteurs de transcription) et extrinsèques (facteurs de croissance).

Le GM-CSF, un facteur de croissance, et PU.1, un facteur de transcription, jouent des rôles importants pour le développement de la lignée myéloïde. Le GM-CSF permet notamment la différenciation et la survie des cellules myéloïdes tandis que PU.1 active la transcription de nombreux gènes myéloïdes importants pour la fonctionnalité de ces cellules.

Ainsi, nous avons voulu savoir si PU.1 et le GM-CSF pouvaient collaborer pour permettre le développement des cellules myéloïdes. Nous montrons que dans des précurseurs myéloïdes purifiés, le GM-CSF fait augmenter le niveau d'expression de PU.1 ainsi que de Mcl-1 et de A1, deux gènes anti-apoptotiques montrés ici comme gènes-cibles de PU.1. Nous montrons également que la diminution du niveau d'expression de PU.1 dans des cellules de moelle osseuse primaire fait diminuer le niveau d'expression de A1 et de Mcl-1 et bloque l'effet anti-apoptotique du GM-CSF. Enfin, nous montrons que lorsque le niveau d'expression de PU.1 est diminué, celui des gènes érythroïdes est augmenté, suggérant que PU.1 enclenche le développement myéloïde au détriment de la lignée érythroïde.

Tous ces résultats suggèrent que le GM-CSF pourrait consolider le développement myéloïde via PU.1, ce qui aurait pour effet de

promouvoir la survie des cellules et d'enclencher le programme de différenciation myéloïde.

Mots clés : GM-CSF, PU.1, Mcl-1, A1, différenciation myéloïde, apoptose, hématopoïèse.

ABSTRACT

The hematopoietic tissue is composed of many mature cell types that are all derived from a single cell, the hematopoietic stem cell. There are many factors determining lineage choice and they can be divided in two categories: intrinsic factors (transcription factors) and extrinsic factors (growth factors).

GM-CSF, a growth factor, and PU.1, a transcription factor, both play an important role in the development of myeloid cells. GM-CSF activates the differentiation and survival of myeloid cells, while PU.1 activates the expression of many myeloid genes that play roles in myeloid cell functions.

Since GM-CSF and PU.1 are both important for myeloid cells, we wanted to know whether they can collaborate to induce the development of these cells. We show in this study that GM-CSF upregulates the expression of PU.1, Mcl-1 and A1, the latter two being anti-apoptotic genes, in purified granulocyte and macrophage progenitors (GMPs). Furthermore, we provide functional evidence for a genetic pathway involving GM-CSF, PU.1 and Mcl-1 / A1, shown here to be direct PU.1 target genes. Decreasing PU.1 protein levels specifically disrupts Mcl-1 and A1 mRNA levels and prevents the anti-apoptotic effect of GM-CSF. Finally, we show that cells expressing decreased PU.1 levels express increased erythroid genes, suggesting that PU.1 could favour the myeloid differentiation program at the expense of the erythroid program. We therefore conclude that GM-CSF

consolidates the myeloid fate through an up-regulation of PU.1 that favors myeloid cell survival and the myeloid differentiation program.

Key words : GM-CSF, PU.1, Mcl-1, A1, myeloid differentiation, apoptosis, hematopoiesis.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XVII
 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	 1
1. L'HÉMATOPOÏÈSE	2
1.1 <i>Hématopoïèse primitive et définitive</i>	2
1.2 <i>Cellules souches</i>	3
1.3 <i>Théories</i>	3
1.4 <i>Le concept de niche et la division asymétrique</i>	4
2. LES FACTEURS QUI RÉGULENT L'HÉMATOPOÏÈSE	5
2.1 <i>Facteurs intrinsèques</i>	5
2.2 <i>Facteurs extrinsèques</i>	7
2.3 <i>Survie et différenciation</i>	8
2.4 <i>La famille Bcl-2 et l'apoptose</i>	9
3. LA MYÉLOPOÏÈSE	10
3.1 <i>Immunité innée versus adaptative</i>	10
3.2 <i>Rôle et fonctions des macrophages</i>	11
4. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION PU.1	12
4.1 <i>Découverte</i>	12
4.2 <i>Famille</i>	12

4.3 Structure	13
4.4 Fonction de transcription	14
4.5 Fonction dans l'hématopoïèse.....	15
4.6 Antagonisme avec d'autres facteurs de transcription	16
4.7 Inactivation génique de PU.1.....	17
5. LE GM-CSF.....	18
5.1 Découverte du GM-CSF	18
5.2 Fonctions biologiques du GM-CSF.....	19
5.3 Patron d'expression du GM-CSF	20
5.4 Inactivation génique du GM-CSF	21
6. LE RÉCEPTEUR DU GM-CSF	22
6.1 La structure du récepteur du GM-CSF.....	22
6.2 Les fonctions biologiques du récepteur du GM-CSF.....	23
6.3 Inactivation génique du récepteur du GM-CSF.....	24
6.4 Signalisation	25
7. OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	26
LÉGENDE DU TABLEAU	27
LÉGENDE DES FIGURES.....	28
TABLEAU.....	31
FIGURES.....	32
 CHAPITRE 2 : PRÉSENTATION DU MANUSCRIT	39
INTERACTION BETWEEN PU.1 AND GM-CSF IN THE SURVIVAL OF GRANULOCYTE AND MACROPHAGE PROGENITORS.....	40
ABSTRACT	41
INTRODUCTION	42
RESULTS	45
<i>GM-CSF upregulates PU.1 and Mcl-1 in myeloid progenitors.</i>	45
<i>Mcl-1 and A1 as PU.1 target genes in primary myeloid cells ..</i>	46

<i>Decreasing PU.1 protein levels prevents the anti-apoptotic effect of GM-CSF in myeloid cells.....</i>	<i>48</i>
<i>PU.1 is specifically required for the response of myeloid progenitors to GM-CSF-dependent survival cue.....</i>	<i>50</i>
DISCUSSION.....	51
<i>A genetic pathway involving the GM-CSF receptor, PU.1 and Mcl-1</i>	<i>51</i>
<i>Cytokine signaling and cell fate.....</i>	<i>53</i>
EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	57
REFERENCES	61
FIGURE LEGENDS	70
FIGURES.....	75
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	82
<i>Analyse clonale de la fonction de PU.1 et de la différenciation érythroïde.....</i>	<i>82</i>
RÉFÉRENCES	84
LÉGENDE DE LA FIGURE.....	85
FIGURE 8	86
 CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION	 87
1. DISCUSSION.....	88
<i>1.1 Une voie génétique impliquant le récepteur du GM-CSF, PU.1 et Mcl-1 / A1</i>	<i>89</i>
<i>1.2 Destin cellulaire, cytokines et facteurs de transcription ...</i>	<i>93</i>
<i>1.3 L'implication des voies de signalisation Jak / STAT et MAPK.....</i>	<i>97</i>
2. CONCLUSION	98
RÉFÉRENCES	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Gènes dont l'expression est régulée par PU.1	30
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure I. Hématopoïèse normale chez l'adulte	32
Figure II. Facteurs intrinsèques essentiels pour l'hématopoïèse normale	33
Figure III. Facteurs extrinsèques essentiels pour l'hématopoïèse normale.	34
Figure IV. La protéine PU.1 et ses domaines fonctionnels chez la souris.....	35
Figure V. Les effets du GM-CSF	36
Figure VI. Structure du récepteur du GM-CSF	37
Figure VII. Voies de signalisation activées par le récepteur du GM-CSF	38
Figure 1. GM-CSF Up-Regulates PU.1 and Mcl-1 Expression in Myeloid Progenitor Cells.....	75
Figure 2. PU.1 Occupies the Mcl-1 and A1 Promoters <i>in vivo</i>	76
Figure 3. Antisense PU.1 Decreases PU.1 Protein Levels and Causes Apoptosis in CD11b-Positive Cells.	77
Figure 4. Decreased PU.1 Levels Decreases Mcl-1 and A1 Levels in Bone Marrow Cells	78

Figure 5. Apoptosis and Cell Growth in Purified GMP and MEP	79
Figure 6. Effect of Decreased PU.1 Levels on Colony Forming Cells..	80
Figure 7. Direct Correlation Between PU.1, Mcl-1 and A1 mRNA Levels in AML	81
Figure 8. Analyse clonale de la fonction de PU.1 et de la différenciation érythroïde	86

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

A1	B-cell leukemia / lymphoma 2 related protein a1
AGM	aorte-gonade-mésonéphros
AML	Acute myeloid leukemia (Leucémie myéloïde aigue)
AML1	Acute myeloid leukemia 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor
API5	Apoptosis inhibitor 5
AS-PU.1	PU.1 dans l'orientation anti-sens
Bad	B-cell leukemia / lymphoma 2 antagonist of cell death
Bak	B-cell leukemia / lymphoma 2 antagonist/killer protein
Bax	B-cell leukemia / lymphoma 2 associated X protein
Bcl-2	B-cell leukemia / lymphoma 2
Bcl-x _L	B-cell leukemia / lymphoma – like 1
BCR	B-cell receptor
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	B-cell leukemia / lymphoma 2 interacting mediator
Bmi-1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
Bok	B-cell leukemia / lymphoma 2 related ovarian killer
BTK	Bruton α globulinemia tyrosine kinase
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
C/EBP α	CCAAT/enhancer binding protein α
C/EBP β	CCAAT / enhancer binding protein β
c-Fes	Cellular feline sarcoma oncogene
c-Fos	Cellular FBJ osteosarcoma oncogene
c-Jun	v-Jun viral related oncogene
c-Myc	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene
c-Rel	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
CLP	Common lymphoid progenitor
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMP	Common myeloid progenitor

CRE-2	cAMP response element protein 2
CSF	Colony stimulating factor
E2A	E2A immunoglobuline enhancer binding factors E12 / E47
EPO	Érythropoïétine
ERK1/2	Extracellular regulated kinase 1/2
ETS	Erythroblast transformation specific domain
Ets-1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
Ets-2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
Fli-1	Friend leukemia integration 1
Flk-1	Fetal liver kinase 1
GATA-1	GATA binding protein 1
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating factor
GMP	Granulocyte-Macrophage progenitor
GMR $\alpha\beta$	GM-CSF Receptor α and β
gp91(phox)	Glycoprotein 91, NADPH oxidase
GPA	Glycophorine A
Grb-2	Growth factor receptor-bound protein 2
HSC	Hematopoietic stem cell (cellule souche hématopoïétique)
ICSBP	Interferon consensus sequence-binding protein
Ig κ	Immunoglobulin light chain κ
IL-1	Interleukine-1
IL-1 β	Interleukine-1 β
IL-1ra	Interleukine-1 receptor antagonist
IL-3	Interleukine-3
IL-5	Interleukine-5
IL-6	Interleukine-6
IL-11	Interleukine-11
IRF	Interferon regulatory factor
Jak2	Janus kinase 2
LacZ	β -galactosidase

LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MB1	Membrane glycoprotein 1
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MEP	Megakaryocyte-Erythrocyte progenitor
Mip-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
Mitf	Microphthalmia associated transcription factor
NK	Natural killer cells
p38MAPK	Protein 38 mitogen activated protein kinase
p47(phox)	protein 47, NADPH oxidase
Pax-5	Paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator)
PEST	domaine proline-acide glutamique-sérine-thréonine
PGK	Phosphoglycerate kinase
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3 kinase
Pip	PU.1 interacting partner
pRB	Retinoblastoma
PU.1	Purine-rich 1
Pub	PU.1 binding protein
RNS2	Ribonuclease
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SCL	Stem cell leukemia gene
SF	Steel factor
SFFV	Spleen focus forming virus
Shc	Src homology 2 domain-containing transforming protein C1
Spi-1	Spleen focus forming virus proviral integration 1
Spi-B	Spleen focus forming virus proviral integration B
STAT	Signal transducers and activators of transcription
STAT-5	Signal transducer and activator of transcription 5

Tel1	ETS variant gene 6 (ETV-6)
TCR	T-cell receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WSXWS	Domaine Tryptophane-Sérine-X-Tryptophane-Sérine

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout d'abord ma directrice de recherche, Trang Hoang, pour avoir su bien me guider tout au long de ma maîtrise. Vous m'avez proposé un projet de recherche très stimulant que j'ai beaucoup aimé. Vous avez toujours su trouver les bons mots pour m'encourager et piquer ma curiosité scientifique, même dans les moments difficiles. Vous m'avez donné l'opportunité de m'épanouir en tant que scientifique, en développant chez moi un sens critique et une habileté à bien communiquer avec mes collègues. Je garde de mon passage au laboratoire d'excellents souvenirs et vous suis extrêmement reconnaissante pour tous les efforts que vous avez investis chez moi.

J'aimerais ensuite remercier André Haman, qui est devenu un bon ami durant mon passage au laboratoire. Merci pour tes conseils judicieux et ta bonne humeur contagieuse. Merci d'avoir pris mon projet à cœur et de m'avoir soutenue pendant toutes ces années.

À tous mes collègues de travail, je dis merci. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Vous êtes devenus mes amis et je vous quitte le cœur gros.

Merci à mes parents, qui m'ont toujours encouragée à étudier et à me dépasser. C'est grâce à vous si j'ai réussi. Votre amour, votre confiance ainsi que votre soutien constant et inconditionnel m'ont permis de m'épanouir et m'ont donné la force de mener à bien ce projet. Merci aussi à Julien, mon frère, qui a constamment été pour moi (et continue de l'être) une source d'admiration et de motivation.

Merci à Sébastien, mon mari et mon meilleur ami, pour ton amour et ton dévouement. Tu as toujours été à mes côtés pour m'épauler, m'encourager, me stimuler, me conseiller. Cette réussite est aussi la tienne.

Merci enfin au Fonds de Recherche en Santé du Québec, qui a cru en mon projet et m'a supporté financièrement durant ma maîtrise.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. L'HÉMATOPOÏÈSE

Chaque jour, l'organisme humain produit plus de 10^{12} cellules sanguines. Ces cellules servent à répondre à un besoin particulier (par exemple, l'hypoxie) ou simplement à régénérer le tissu sanguin. Ce processus, appelé hématopoïèse, est complexe et tous les mécanismes qui le régulent ne sont pas encore identifiés. La présente étude portera plus particulièrement sur le développement des cellules myéloïdes, une branche spécifique de l'hématopoïèse, et sur les différents facteurs qui permettent le développement des cellules myéloïdes matures. Cette introduction présentera donc les thèmes de l'hématopoïèse, de la myélopoïèse et de la régulation de ces processus par deux grandes classes de facteurs, soient les facteurs de transcription et les récepteurs à cytokine.

1.1 Hématopoïèse primitive et définitive

Les premières cellules hématopoïétiques embryonnaires sont générées dans le sac vitellin, à partir du mésoderme. Chez la souris, ce processus se produit relativement tôt dans le développement, soit au jour embryonnaire 7.5 (revu dans (Cortes and Labastie, 2004)). Les cellules produites consistent en des globules rouges primitifs nucléés. Plus tard, vers la mi-gestation, le foie fœtal devient le siège de l'hématopoïèse définitive. Enfin, avant la naissance, la moelle osseuse devient le site principal de l'hématopoïèse définitive, et le demeure durant toute la vie de l'organisme. Cependant, la région AGM (aorte-gonade-mésonephros) chez l'embryon pourrait aussi contribuer de façon significative à l'hématopoïèse définitive. Les cellules souches provenant de cette région migreraient et coloniseraient elles aussi le

foie fœtal pour donner naissance à des cellules hématopoïétiques plus matures.

1.2 Cellules souches

L'hématopoïèse est le processus de formation de toutes les cellules composant le tissu sanguin. Toutes ces cellules sont dérivées à partir d'une seule cellule primitive, la cellule souche hématopoïétique (HSC) (voir Figure 1). La cellule souche hématopoïétique a la capacité de s'auto-renouveler (maintien du bassin de cellules souches) et de se différencier (formation des cellules sanguines matures). La différenciation est progressive et les intermédiaires entre la cellule souche et la cellule mature peuvent être isolés grâce à l'expression de certaines protéines de surface spécifiques (Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000). Plus la cellule se différencie, moins elle a le potentiel de former plusieurs types cellulaires. Par exemple, la cellule souche hématopoïétique peut choisir de se différencier en CMP (common myeloid progenitor). Cette dernière a le potentiel de former des érythrocytes, des mégacaryocytes, des granulocytes, des macrophages et des cellules dendritiques, mais pas de lymphocytes (Akashi et al., 2000). Si le CMP se différencie en GMP (granulocyte-macrophage progenitor), il aura le potentiel de former des macrophages, des granulocytes et des cellules dendritiques, mais pas d'érythrocytes ou de mégacaryocytes, et ainsi de suite pour tous les progéniteurs. Plus une cellule est différenciée, plus le potentiel de former toutes les cellules du tissu hématopoïétique est restreint.

1.3 Théories

Il existe deux théories majeures qui tentent d'expliquer comment le destin cellulaire s'établit. La première propose un modèle stochastique

de différenciation, selon lequel le destin d'une cellule (auto-renouvellement ou différenciation) est un processus aléatoire qui dépend de facteurs intrinsèques à la cellule (revu dans (Hoang, 2004)). La seconde théorie suggère un modèle inductible ou déterministe. Il existe deux écoles de pensée pour ce modèle, soit le modèle de potentiel prédéterminé et le modèle de contrôle extra-cellulaire de la différenciation (revu dans (Kirkland, 2004; Hoang, 2004)). La première école suggère que le potentiel de différenciation de la cellule souche est préprogrammé et que les facteurs de croissance jouent un rôle permissif seulement, comme de promouvoir la survie cellulaire ou d'activer le transit du cycle cellulaire. La seconde école propose que le destin cellulaire est déterminé par une combinaison de facteurs de croissance qu'une cellule donnée rencontre. De nouvelles approches (comme celle discutée dans le prochain point) montrent la nécessité d'un nouveau modèle qui tient compte de toute la complexité de l'hématopoïèse.

1.4 Le concept de niche et la division asymétrique

Comment une cellule souche décide-t-elle de se différencier ou de s'auto-renouveler? Des études chez la drosophile ont fourni une partie de la réponse. La génération des cellules germinales chez la drosophile se produit dans la partie apicale des ovaires et des testicules. Cette région fonctionne dans un micro-environnement appelé niche. Par exemple, dans les testicules de drosophiles, environ neuf cellules germinales entourent un petit groupe de cellules somatiques, appelé moyeu (*hub*) (traduction libre). Ces cellules somatiques sécrètent des facteurs essentiels pour l'auto-renouvellement des cellules germinales. Les cellules situées à proximité du moyeu reçoivent de hauts niveaux de ces signaux et donc déclenchent le processus d'auto-renouvellement. Les cellules situées plus loin reçoivent moins de signal

et se différencient alors en spermatogonies. Un groupe a montré, par des techniques de fluorescence, que les cellules orientent toujours le plan de leur division cellulaire de façon perpendiculaire au moyeu, c'est-à-dire qu'une cellule reste attachée au moyeu et l'autre est repoussée vers l'extérieur de la niche (Yamashita et al., 2003). La cellule située près du moyeu reste donc toujours une cellule souche, alors que l'autre entre dans un programme de différenciation pour former une cellule mature. Toutes les divisions observées dans la niche ont été des divisions asymétriques. Les études chez la drosophile suggèrent que le mode d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques pourrait être semblable.

2. LES FACTEURS QUI RÉGULENT L'HÉMATOPOÏÈSE

L'hématopoïèse est un système dynamique, qui répond aux besoins de l'organisme. Plusieurs facteurs peuvent donc moduler la formation des cellules sanguines. Ces facteurs sont regroupés en deux catégories : les facteurs intrinsèques (qui proviennent de l'intérieur de la cellule) et les facteurs extrinsèques (qui proviennent de l'environnement).

2.1 Facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques sont essentiellement les protéines qui régulent l'expression génique, soient les facteurs de transcription. Il existe de nombreux exemples de facteurs de transcription dont la présence est cruciale pour le développement d'un tissu ou d'une lignée cellulaire donnés et ce, autant au niveau de l'hématopoïèse que la génération d'autres organes ou tissus.

Les facteurs de transcription jouent un rôle important autant chez les cellules souches que chez les cellules plus matures. Il est connu que

certaines de ces facteurs démarrent et maintiennent un programme de différenciation particulier.

Des études d'inactivation génique chez la souris ont montré que les facteurs de transcription AML1, Bmi-1, GATA-2 et SCL (Figure II), pour ne nommer que ceux-là, ont des rôles critiques au niveau de la génération et de l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques à partir de précurseurs embryonnaires, et que l'hématopoïèse primitive et définitive sont déficientes ou carrément absentes (revu dans (Lessard et al., 2004)).

Les facteurs de transcription jouent aussi un rôle au niveau de la détermination d'une lignée au sein du système hématopoïétique. Le facteur de transcription E2A, par exemple, est important pour qu'une cellule immature s'engage dans le programme de différenciation lymphoïde. De plus, ce facteur détermine si la cellule poursuit sa différenciation en lymphocyte B ou T. En effet, il est connu qu'un faible niveau d'expression de E2A engage la cellule vers la voie T, alors qu'une expression plus forte favorise la voie B (revu dans (Hoang, 2004)). Les facteurs de transcription SCL et GATA-1 sont nécessaires, quant à eux, pour la formation des érythrocytes. SCL active la transcription de plusieurs gènes érythroïdes comme la glycophorine A (Lahlil et al., 2004) et la protéine 4.2 (Xu et al., 2003). Les promoteurs de ces gènes contiennent aussi des sites de liaison pour GATA-1 et sont plus fortement activés en présence de ce dernier. Enfin, le facteur de transcription PU.1 est essentiel pour la formation des granulocytes, des macrophages et des lymphocytes B. Tout comme dans le cas de E2A, PU.1 joue un rôle différent selon son degré d'expression. Une faible expression de PU.1 conduit à la lignée lymphoïde, alors qu'une plus forte expression conduit à la lignée myéloïde (DeKoter and Singh, 2000). De même, au sein de la lignée myéloïde, une plus forte expression favorise le développement de la cellule en macrophage, alors qu'une expression plus faible mène au développement des

granulocytes (Dahl et al., 2003). Le rôle spécifique de PU.1 lors du développement des macrophages sera discuté plus loin.

2.2 Facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques sont les facteurs provenant de l'environnement, comme les cytokines, les facteurs de croissance, les hormones, les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice; bref, tous les signaux extracellulaires. Ce texte s'attardera plus particulièrement sur le rôle des cytokines. Elles sont actives dans toutes les étapes du développement hématopoïétiques, de la cellule souche à la cellule mature (Figure III). Par contre, contrairement aux facteurs de transcription, leur rôle est plus passif, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas les facteurs qui démarrent un programme de différenciation (Hoang, 2004). Leur rôle est de soutenir et de maintenir un programme de différenciation déjà amorcé ou déterminé. Plusieurs évidences soutiennent cette affirmation.

Par exemple, l'érythropoïétine (EPO) est une cytokine qui augmente la production d'érythrocytes dans le foie fœtal et la moelle osseuse. La conséquence de ceci est l'augmentation directe de la quantité d'oxygène transportée et livrée aux muscles et aux tissus. La cytokine permet une réponse relativement rapide aux besoins de l'organisme en cas d'hypoxie, par exemple. L'EPO est requise pour la production d'érythrocytes mais elle n'est pas essentielle pour l'engagement vers la lignée érythrocytaire, puisque l'inactivation du gène de l'EPO ou de son récepteur chez la souris permet toujours la génération de progéniteurs engagés dans la voie de différenciation érythroïde (Wu et al., 1995). De même, le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), le M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) et le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) sont requis pour la formation des cellules myéloïdes, mais l'inactivation de ces gènes chez la souris

montre qu'aucun n'est absolument nécessaire pour la formation des macrophages ou des granulocytes (Cecchini et al., 1994; Seymour et al., 1997). Le rôle du GM-CSF sera discuté plus en profondeur dans les prochains chapitres.

2.3 Survie et différenciation

Pour survivre, une cellule hématopoïétique a constamment besoin de signaux de l'extérieur, que ce soit à travers les interactions cellule-cellule ou par des facteurs de croissance ou autres molécules circulantes. Si la cellule ne reçoit pas ces signaux, elle entre en apoptose, par défaut (Cowling and Dexter, 1994). Le rôle des cytokines est donc double : elles doivent d'abord assurer la survie de la cellule ciblée avant d'avoir un effet plus spécifique sur elle (différenciation ou autre fonction cellulaire). Ceci est également en accord avec la théorie qui veut que les cytokines aient un rôle permissif dans la différenciation, plutôt qu'instructif. En effet, les cytokines pourraient permettre la survie d'un précurseur donné et ainsi consolider un programme de différenciation déjà amorcé par des facteurs intrinsèques, par exemple. Quoiqu'il en soit, les fonctions de survie et de différenciation sont intimement reliées : sans survie, pas de différenciation.

Le processus d'apoptose est assez bien caractérisé. Deux voies majeures permettent d'induire la mort cellulaire programmée : la voie intrinsèque (par la mitochondrie, les caspases et les protéines de la famille Bcl-2) et la voie extrinsèque (par les récepteurs Death). Ces voies convergent, notamment au niveau des caspases. La voie intrinsèque est activée, entre autres, par un support inadéquat de la part des cytokines et sera traitée plus en profondeur pour cette raison.

2.4 La famille Bcl-2 et l'apoptose

La famille Bcl-2 est composée d'environ une vingtaine de membres, qui peuvent être classés en deux catégories : les molécules anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, A1) et les molécules pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bok, Bim, Bad, Bid). Ces dernières peuvent encore être sous-divisées, selon leur structure : les molécules à domaine *BH3-only* (Bim, Bad, Bid) et les molécules à domaine *multi-BH* (Bax, Bak, Bok) (revu dans (Adams, 2003)). Les protéines *BH3-only* sont les antagonistes des molécules anti-apoptotiques, alors que les autres jouent un rôle en aval.

Bcl-2, par exemple, est retrouvé du côté cytoplasmique de la membrane mitochondriale externe en tout temps (Janiak et al., 1994), alors que d'autres, comme Mcl-1, sont cytoplasmiques (Nijhawan et al., 2003). En temps normal, les protéines anti-apoptotiques titrent les protéines pro-apoptotiques *BH3-only* et les empêchent d'activer les protéines *multi-BH*. Lors d'un signal apoptotique, les molécules *BH3-only* s'associent aux molécules anti-apoptotiques et lesaturent, recrutant ainsi les molécules *multi-BH* à la membrane mitochondriale (revu dans (Adams, 2003)). Ces dernières s'oligomérisent pour engendrer une perméabilisation de la membrane et le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (Antonsson et al., 2000; Saito et al., 2000). Le cytochrome c active alors Apaf-1, une protéine d'assemblage (*scaffold*). Cette dernière change de conformation, s'oligomérisise en heptamère (formant ainsi l'apoptosome) et recrute la procaspase-9 (Acehan et al., 2002). La procaspase-9 subit un changement allostérique, ce qui l'active (Rodriguez and Lazebnik, 1999). Elle peut alors activer les caspases 3 et 7, ce qui initie la protéolyse et libère des DNases qui clivent la chromatine (Enari et al., 1998). La cellule est alors éliminée de façon silencieuse. Le rôle des cytokines dans ce processus reste à être élucidé, mais de plus en plus d'études suggèrent qu'elles permettent

l'expression des molécules anti-apoptotiques afin d'assurer la survie des cellules.

3. LA MYÉLOPOÏÈSE

3.1 Immunité innée versus adaptive

Les cellules qui composent le tissu hématopoïétique jouent plusieurs rôles importants, tels que le transport d'oxygène et de dioxyde de carbone (érythrocytes), la coagulation et l'hémostase (mégacaryocytes et plaquettes) et la défense contre les corps étrangers. Il existe deux types d'immunité, qui sont complémentaires.

Le premier type d'immunité est appelé inné ou naturel, puisqu'il existe avant que l'organisme ne soit exposé aux microbes. Les cellules impliquées ne discriminent pas entre les différentes substances étrangères et la réponse immunitaire n'est pas augmentée avec une exposition subséquente d'un pathogène donné.

Le second type d'immunité est appelé acquis ou adaptatif. Ce type de réponse immunitaire est stimulé par l'exposition à un pathogène particulier et est spécifique à des macromolécules distinctes. À chaque exposition, la réponse immunitaire est plus forte et plus efficace.

Les cellules qui composent chaque type d'immunité sont en relation étroite les unes avec les autres. Chaque mécanisme agit de concert avec l'autre. Par exemple, lors de la réaction immunitaire adaptative, les lymphocytes T sécrètent des cytokines qui activent les macrophages, les rendant plus efficaces à la phagocytose, donc à l'élimination d'un pathogène donné. Inversement, les pathogènes qui sont absorbés par phagocytose sont présentés à la surface de la cellule, rendant ainsi leur reconnaissance par les lymphocytes T plus facile et plus efficace.

Il existe plusieurs types de cellules qui jouent un rôle important lors de la réponse immunitaire, notamment les lymphocytes T et B, les cellules NK (natural killer), les cellules dendritiques, les neutrophiles et les macrophages. Ces derniers seront examinés plus en profondeur.

3.2 Rôle et fonctions des macrophages

Les macrophages, comme mentionné ci-haut, sont des cellules présentatrices d'antigène. Ils absorbent les pathogènes par phagocytose, les dégradent à l'aide d'enzymes lysosomales, et ils expriment certains peptides (antigènes) à la surface cellulaire avec des molécules d'histocompatibilité de type II. Les antigènes sont ainsi reconnus par les lymphocytes T et la réponse immunitaire adaptative est facilitée. De plus, les macrophages sont des « charognards » : ils détruisent, en même temps que les pathogènes, les débris ou les cellules du soi qui sont mortes, soit par phagocytose, soit en sécrétant des enzymes ou des ROS (reactive oxygen species). Les macrophages jouent donc un double rôle : ils détruisent les pathogènes (immunité innée) et, en exprimant certains peptides à la surface cellulaire, rendent la réponse immunitaire adaptative plus efficace.

Les macrophages sont retrouvés dans tous les tissus conjonctifs et organes, mais sont générés dans la moelle osseuse à partir de la cellule souche hématopoïétique (HSC). Les macrophages qui quittent la moelle pour rejoindre la circulation périphérique sont immatures et portent le nom de monocytes. Lorsque les monocytes s'installent dans les tissus, ils se différencient de façon terminale et sont alors appelés des macrophages. Une fois dans les tissus, les macrophages peuvent être activés par plusieurs stimuli pour combattre l'infection.

Il ressort de tout ce qui précède que la production de monocytes dans la moelle osseuse dépend du facteur de transcription PU.1 et qu'elle

peut être régulée par le GM-CSF. Ces deux facteurs sont décrits avec plus de détails dans les chapitres suivants.

4. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION PU.1

4.1 Découverte

Le facteur de transcription PU.1 a été cloné simultanément par deux groupes de recherche différents, et de manière différente. Le premier groupe étudiait l'érythroleucémie de Friend et ses causes. Cette leucémie présente la caractéristique d'être induite par le virus SFFV (spleen focus forming virus), qui perturbe l'expression de gènes particuliers à la hausse. Dans 95% des tumeurs érythroïdes étudiées, le site d'intégration de ce virus était le locus Spi-1 (SFFV proviral integration) (Moreau-Gachelin et al., 1988; Moreau-Gachelin et al., 1989). Le second groupe, quant à lui, cherchait de nouvelles protéines capables d'interagir avec le promoteur du gène d'histocompatibilité majeur de classe II (CMH II). Le criblage d'une banque de cDNA a révélé une protéine se liant sur un site riche en purines, d'où l'appellation PU.1 (purine rich), et exprimée dans les macrophages et les lymphocytes B (Klemsz et al., 1990). Il s'est avéré plus tard que Spi-1 et PU.1 étaient identiques (Goebel, 1990).

4.2 Famille

PU.1 fait partie de la famille de facteurs de transcription ETS (erythroblast transformation specific domain), dont le prototype est ets-1. Cette famille comporte plus de 30 membres qui sont majoritairement impliqués dans le développement du tissu hématopoïétique. Le domaine ETS est un domaine de liaison à l'ADN arrangé sous forme

d'hélice-tour-hélice interagissant avec une région d'ADN de 10 paires de bases. La séquence consensus est composée majoritairement de purines et est typiquement 5'-GGAA/T-3'. Parmi les membres de la famille ETS figurent ets-1 (impliqué dans le développement de la lignée lymphocytaire B et T), ets-2 (structures extra-embryonnaires), Spi-B (lymphocytes B), Fli-1 (mégacaryocytes et érythrocytes) et Tel (angiogénèse du sac vitellin et hématopoïèse adulte) (revu dans (Bartel et al., 2000)).

4.3 Structure

En plus de son domaine de liaison à l'ADN ETS, PU.1 comporte un domaine riche en acides aminés acides et en glutamines ainsi qu'un domaine PEST (Figure IV). Le domaine riche en acides aminés acides et en glutamine est le domaine de transactivation de PU.1, c'est-à-dire le domaine qui confère l'activité d'activation de la transcription. De plus, il comporte deux sérines en position 41 et 45 qui peuvent être phosphorylées et qui semblent nécessaires pour la prolifération cellulaire des macrophages induite par le M-CSF (Celada et al., 1996). Le domaine PEST, quant à lui, est un domaine fréquemment retrouvé chez d'autres protéines. Il est composé des acides aminés suivants : proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T). Ce domaine est reconnu pour stabiliser les protéines (Rogers et al., 1986) et peut aussi les cibler pour une dégradation par le protéasome (Rechsteiner and Rogers, 1996). Le domaine PEST permet enfin certaines interactions protéine-protéine. Par exemple, la sérine en position 148 permet à Pip (PU.1 interacting partner) de s'associer à PU.1 si elle est phosphorylée. Finalement, le domaine ETS, tel que mentionné ci-haut, est le domaine de liaison à l'ADN. Il permet à PU.1 de se lier sur sa séquence consensus sous forme de monomère.

4.4 Fonction de transcription

À lui seul, PU.1 n'active pas la transcription de façon puissante. L'activité basale du promoteur de ses gènes-cibles est augmentée d'environ cinq fois seulement (Grondin et al., en préparation). Afin d'activer la transcription de façon efficace, PU.1 s'associe à différents partenaires selon le contexte cellulaire. Plusieurs partenaires connus de PU.1 sont des protéines exprimées dans la lignée des lymphocytes B. Le partenaire le plus connu de PU.1 est Pip. Ce dernier doit interagir avec PU.1 pour être recruté au promoteur de la chaîne légère Ig κ (Brass et al., 1996; Perkel and Atchison, 1998), et il le fait par l'intermédiaire de la sérine 148 phosphorylée. Un autre partenaire connu de PU.1 est Pub (PU.1 binding protein). Pub est exprimé dans la plupart de organes hématopoïétiques (rate, thymus, foie), dans la lignée des lymphocytes B et dans les macrophages de la rate. Pub diminue l'activité transcriptionnelle de PU.1 sur le promoteur de la chaîne légère Ig κ , ce qui laisse croire que Pub est un co-répresseur (Hirose et al., 2003). Cette hypothèse reste à être démontrée. De plus, PU.1 est capable d'interagir avec Mitf pour activer la transcription du gène ostéoclastique TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) dans une lignée hétérologue (Luchin et al., 2001). Par contre, la signification biologique de ceci est inconnue puisqu'un autre groupe a montré que PU.1 ne se liait pas sur ce promoteur chez les ostéoclastes (Partington et al., 2004). PU.1 peut aussi s'associer à pRB, un co-répresseur connu, afin d'inhiber le facteur de transcription GATA-1 dans la lignée érythrocytaire MEL, ce faisant réprimant la différenciation érythroïde (Rekhtman et al., 2003). L'antagonisme entre PU.1 et GATA-1 est bien connu et sera discuté plus loin. PU.1 peut également s'associer avec c-Jun et C/EBP β , deux facteurs ubiquitaires, pour activer la transcription du gène de l'interleukine-1 β (Grondin et al., en préparation), un gène myéloïde, et permettre la différenciation terminale des macrophages en

macrophages activés. Enfin, il a été rapporté que PU.1 pouvait s'associer directement avec deux facteurs de la famille des IRF (interferon regulatory factor), Pip et ICSBP, pour former un enhanceosome et activer le promoteur de l'IL-1 β dans une lignée hétérologue (Marecki et al., 2001). Plusieurs évidences suggèrent un rôle important de ICSBP dans la maturation des monocytes en macrophages, par l'activation de l'expression de nombreux gènes fonctionnels chez les macrophages comme le lysozyme et la cathepsine C (Tamura et al., 2000; Tamura et al., 2005). ICSBP pourrait donc être retrouvé en tant que partenaire de PU.1 sur plusieurs gènes lors de la maturation des monocytes (revu dans (Friedman, 2002)).

4.5 Fonction dans l'hématopoïèse

PU.1 est un facteur histospécifique, exprimé seulement au niveau du tissu hématopoïétique. Au niveau des cellules matures, il est retrouvé chez les monocytes / macrophages et les lymphocytes B, et au niveau des cellules immatures, chez les CMP, les GMP et les CLP. De plus, PU.1 est retrouvé en très faible quantité chez les cellules souches hématopoïétiques (Akashi et al., 2000).

Parmi les gènes-cibles de PU.1, on ne retrouve que des gènes spécifiques aux cellules myéloïdes ou aux lymphocytes B. Plusieurs sont des récepteurs (notamment de facteurs de croissance) ou des immunoglobulines, mais PU.1 régule aussi la transcription d'autres gènes spécifiques dont l'activité est essentielle pour le bon fonctionnement de la cellule myéloïde. Par exemple, PU.1 régule la transcription d'enzymes protéolytiques impliquées dans la dégradation des pathogènes et de cytokines inflammatoires. Une courte liste (incomplète) est présentée au tableau I (revu dans (Lloberas et al., 1999)). PU.1 régule donc l'expression de plusieurs gènes requis pour la différenciation terminale des macrophages et des lymphocytes B.

Cependant, il a été mentionné plus tôt que les fonctions de différenciation et de survie sont intimement liées. Il est donc possible que PU.1 puisse réguler la transcription de gènes impliqués dans la survie des cellules, quoique cette possibilité ait été peu explorée jusqu'à maintenant.

4.6 Antagonisme avec d'autres facteurs de transcription

En plus d'interagir avec des partenaires qui augmentent ou répriment son activité transcriptionnelle, PU.1 peut également interagir directement avec d'autres régulateurs-clé de l'hématopoïèse, comme GATA-1 et C/EBP α , et ainsi inhiber leurs fonctions.

GATA-1 est un facteur de transcription à doigts de zinc extrêmement important pour la formation des érythrocytes. Il est exprimé dans les CMP et son expression devient ensuite restreinte aux MEP. GATA-1 et PU.1 peuvent interagir physiquement ensemble et s'inhiber mutuellement. PU.1 empêche la liaison de GATA-1 à l'ADN (Zhang et al., 2000), tandis que GATA-1 prévient l'association de PU.1 à un cofacteur (Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1999).

C/EBP α , quant à lui, est un facteur de transcription important pour la différenciation terminale de précurseurs en granulocytes. En effet, l'inactivation génique de C/EBP α chez la souris bloque le développement des cellules de la lignée granulocytaire. C/EBP α peut interagir directement avec PU.1 et inhiber la transactivation de ses gènes-cibles. Ultimement, C/EBP α permet une diminution de l'expression de PU.1, ce qui est un événement important dans la différenciation en granulocyte (Reddy et al., 2002). En effet, c'est un gradient d'expression de PU.1 qui détermine si la cellule se différencie en macrophage (PU.1 fortement exprimé) ou en granulocyte (PU.1 faiblement exprimé) (Dahl et al., 2003).

Comme ces gènes sont tous des régulateurs-clé de leur lignée respective, il est possible de penser que l'abondance relative de chaque facteur pourrait déterminer le choix d'une lignée par rapport à une autre. Par exemple, l'expression ectopique de PU.1 dans des embryons de *Xenopus* bloque l'érythropoïèse, mais la surexpression de GATA-1 dans ces mêmes embryons restaure la formation des érythrocytes (Rekhtman et al., 1999).

4.7 Inactivation génique de PU.1

Afin d'élucider (en partie) la fonction du gène PU.1, deux groupes ont généré des souris exprimant PU.1 de façon aberrante. Le premier groupe a remplacé une portion de l'exon 5 du gène PU.1 (équivalent aux acides aminés 200-272) par le gène de résistance à la néomycine (Scott et al., 1994). Cette forme de PU.1 ne devrait plus se lier à l'ADN puisque son domaine de liaison à l'ADN est tronqué. Cependant, l'analyse des embryons mutants a révélé qu'aucun produit PU.1 n'est généré : cette mutation est une perte de fonction du gène PU.1 (Scott et al., 1997). Les embryons homozygotes pour la construction ne présentent pas de lymphocytes B, de monocytes ou de macrophages, de neutrophiles et de cellules dendritiques dérivées de la lignée myéloïde. De plus, il semble y avoir des défauts de développement dans la lignée des lymphocytes T (Spain et al., 1999; Fisher et al., 1999), et certains embryons souffrent d'anémie, tard dans leur développement. Les embryons meurent au jour embryonnaire 17.5-18. Le second groupe, quant à lui, a inséré le gène de résistance à la néomycine à l'intérieur de l'exon 5, sans effacer aucune partie du gène que ce soit (McKercher et al., 1996). Cette forme de PU.1 ne devrait plus se lier à l'ADN puisque son domaine de liaison à l'ADN est complètement perturbé. Encore une fois, cette construction ne génère aucun produit PU.1 (Iwama et al., 1998). Les embryons générés ont un

phénotype semblable à celui des embryons produits par l'autre groupe, avec des différences subtiles. Les embryons présentent un arrêt de la différenciation des lymphocytes B ainsi que des monocytes et des macrophages (Henkel et al., 1999), ne possèdent pas d'ostéoclastes (Tondravi et al., 1997) ou de cellules dendritiques (Anderson et al., 2000), ont un nombre réduit de neutrophiles et les progéniteurs hématopoïétiques semblent avoir des défauts de *homing*, c'est-à-dire de localisation aux sites d'hématopoïèse adulte (Fisher et al., 1999). Les souris meurent environ 48 heures après la naissance; cependant, un traitement aux antibiotiques prolonge leur survie jusqu'à 17 jours après la naissance.

Des défauts aussi flagrants que ceux générés par l'inactivation génique de PU.1 montrent bien l'importance de cette protéine dans le développement des cellules myéloïdes et lymphoïdes. PU.1 est en fait un régulateur-clé de la myélopoïèse.

5. LE GM-CSF

5.1 Découverte du GM-CSF

La découverte du GM-CSF remonte aux années 1960. Comme plusieurs découvertes, ce fut un peu par accident. Pour la première fois, les scientifiques étaient capables de faire croître des cellules sanguines en culture, dans un milieu semi-solide d'agar. Cependant, les cellules ne croissaient qu'en présence d'un certain facteur, qui fut nommé CSF (colony stimulating factor). La purification de ce CSF fut amorcée à partir de l'urine humaine (matériel peu coûteux et abondant). Après neuf années de tentatives, le CSF fut finalement purifié. Cependant, en culture, ce CSF ne donnait que de petites colonies de macrophages, comparativement aux immenses colonies de granulocytes et de

macrophages observées initialement. Ce CSF fut alors nommé M-CSF (pour macrophage-colony stimulating factor). Au début des années 1970, il devint évident que des CSF purifiés à partir d'organes différents étaient des facteurs de croissance différents. La purification d'un second facteur fut amorcée à partir de poumons. Cette fois-ci, les cellules stimulées par ce *lung*-CSF formaient de belles colonies de granulocytes et de macrophages. Ce facteur fut donc renommé GM-CSF, pour granulocyte macrophage-colony stimulating factor. La purification du G-CSF suivit peu après, de manière un peu accidentelle, car le scientifique cultivant les cellules stimulées par ce CSF les croyait mortes! Vers le début des années 1980, il devint apparent que les CSF non seulement étaient des facteurs qui stimulaient la division cellulaire de cellules immatures pour former des cellules différenciées, mais aussi des facteurs qui stimulaient ces cellules, par exemple, à tuer des bactéries plus efficacement et rapidement. Ces CSF pouvaient donc activer les fonctions de ces cellules. De plus, ces CSF pouvaient aussi induire des cellules leucémiques à se différencier et à tenter d'adopter un comportement de cellule mature. Vers le milieu des années 1980, le GM-CSF fut cloné par le groupe de Donald Metcalf. Depuis, le GM-CSF est utilisé dans la plupart des traitements anti-cancéreux, non pour traiter les cellules cancéreuses, mais surtout pour aider les patients qui ont subi une chimiothérapie à refaire leur système hématopoïétique plus rapidement.

5.2 Fonctions biologiques du GM-CSF

Le GM-CSF fait partie de la famille des cytokines, qui comprend d'autres CSF (G-CSF et M-CSF), les interleukines (IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-11, etc.), l'érythropoïétine (EPO), le Steel Factor (SF), entres autres. Le GM-CSF est une petite protéine d'environ 22 kDa, qui comporte quatre hélices alpha. Sa région N-terminale est responsable de l'interaction

avec la chaîne β du récepteur, alors que la portion C-terminale s'associe de façon spécifique avec la chaîne α du récepteur.

Les fonctions biologiques du GM-CSF sont multiples et peuvent être classées en quatre catégories (Figure V). Le GM-CSF stimule la différenciation, la prolifération (Burgess and Metcalf, 1980), la survie (Caceres-Cortes et al., 2001) et certaines fonctions des cellules myéloïdes, telles que l'adhésion et l'activation par des pathogènes (revu dans (Hamilton, 2002)). De plus, chez les macrophages pulmonaires, le GM-CSF stimule la phagocytose des débris, et le fait via PU.1. En effet, la surexpression de PU.1 dans des macrophages de souris GM-CSF^{-/-} restaure la phagocytose et empêche l'accumulation de débris et de protéines dans les alvéoles (Shibata et al., 2001), une caractéristique retrouvée chez toutes les souris déficientes en GM-CSF.

5.3 Patron d'expression du GM-CSF

Le GM-CSF est difficilement détectable dans la circulation systémique chez l'individu en santé, puisque les niveaux exprimés sont très bas (Cebon et al., 1994). La plupart de la production et de l'action du GM-CSF est locale, au site d'infection, tout comme la majorité des cytokines pro-inflammatoires. Par contre, en réponse à une infection par des endotoxines comme le LPS, les niveaux circulants de GM-CSF deviennent élevés de façon marquée et rapide (Sheridan and Metcalf, 1972).

Plusieurs types cellulaires sécrètent le GM-CSF. Les fibroblastes, les cellules des muscles lisses, les cellules épithéliales des bronches, les cellules endothéliales et les chondrocytes produisent la cytokine en réponse à l'IL-1 et au TNF- α (Zucali et al., 1986; Bagby, Jr. et al., 1986; Leizer et al., 1990; Campbell et al., 1991; Filonzi et al., 1993). Les monocytes aussi produisent du GM-CSF, en réponse aux endotoxines telles que le LPS (Hamilton et al., 1992). Les cellules affectées sont les

cellules de la lignée myéloïde : les macrophages, les granulocytes (éosinophiles et leukocytes polymorphonucléaires) et les précurseurs myéloïdes.

5.4 Inactivation génique du GM-CSF

L'inactivation du gène du GM-CSF a été réalisée chez la souris (Stanley et al., 1994), en remplaçant les deux premiers exons du gène par une construction contenant le gène lacZ suivi du promoteur PGK placé devant le gène de résistance à la néomycine. Les souris homozygotes pour la construction sont viables et ne présentent pas de défauts notables jusqu'à la douzième semaine après la naissance. Toutes les souris développent des poumons anormaux. En effet, il y a accumulation de protéines dans les alvéoles, dû à un mauvais fonctionnement des macrophages. Les symptômes des souris rappellent la maladie de la protéinose alvéolaire. Cependant, aucun défaut dans l'hématopoïèse n'est observé. Tous les comptes cellulaires sont normaux chez ces souris. Ces observations ne suggèrent pas que le GM-CSF n'est pas important pour la myélopoïèse : elles suggèrent seulement que d'autres cytokines pourraient en partie combler une carence en GM-CSF. Le M-CSF et le G-CSF, par exemple, pourraient très bien prendre le relais et assurer le développement des cellules myéloïdes sans le GM-CSF. Par contre, l'inactivation génique du GM-CSF chez la souris montre que cette cytokine n'est pas complètement dispensable, puisque les souris développent une maladie au niveau des poumons, suggérant que le GM-CSF joue un rôle unique pour la différenciation terminale des macrophages pulmonaires.

6. LE RÉCEPTEUR DU GM-CSF

Le GM-CSF est une petite protéine qui ne peut pas, contrairement aux hormones, traverser la membrane cellulaire pour activer un récepteur intra-cellulaire. Le récepteur du GM-CSF est donc un récepteur comportant un domaine extra-cellulaire, permettant la liaison à la cytokine, ainsi qu'un domaine intra-cellulaire, qui transmet des signaux de différenciation, de prolifération, de survie et de fonctions cellulaires spécifiques.

6.1 La structure du récepteur du GM-CSF

Le récepteur du GM-CSF fait partie de la super-famille des récepteurs à cytokine. Cette famille est caractérisée par la présence d'un motif particulier, soit une structure semblable à celle de la fibronectine dans la portion extra-cellulaire de la protéine. Cette structure est composée de quatre résidus cystéine conservés et d'un motif WSXWS (tryptophane – sérine – X – tryptophane – sérine) situé près de la partie intra-membranaire (Figure VI).

Le récepteur en tant que tel est un hétérodimère, composé d'une chaîne spécifique à la cytokine (chaîne α) et d'une chaîne commune (chaîne β), partagée avec les récepteurs de l'IL-3 et de l'IL-5, deux autres cytokines.

La chaîne α est courte et est composée de 378 acides aminés (Gearing et al., 1989). La protéine est presque exclusivement extra-cellulaire avec une portion cytoplasmique de 54 acides aminés seulement. Cette chaîne lie le GM-CSF de façon spécifique avec une faible affinité et malgré ce qu'on pourrait penser, elle joue aussi un rôle important lors de la transduction du signal (Lia et al., 1996).

La chaîne β , quant à elle, est longue (881 acides aminés) et possède un domaine cytoplasmique important de 432 acides aminés (Hayashida

et al., 1990). Cette chaîne, seule, ne possède aucune affinité pour la cytokine. Par contre, les chaînes α et β ainsi que le GM-CSF forment un complexe ternaire de très haute affinité qui se dissocie lentement. La chaîne β est responsable de la transduction du signal. Elle possède deux domaines riches en proline, conservés parmi les récepteurs à cytokine et appelés box1 et box2. Ces deux domaines sont situés tout près de la portion transmembranaire et servent de site de liaison pour la protéine Jak2. Plusieurs tyrosines sont aussi retrouvées dans la portion cytoplasmique du récepteur, en C-terminal. Elles sont responsables de l'induction de différentes voies de signalisation.

Le récepteur du GM-CSF ne possède pas d'activité catalytique en soi. C'est par la liaison de Jak2 que les tyrosines en C-terminal de la chaîne β deviennent phosphorylées et que le signal est propagé.

6.2 Les fonctions biologiques du récepteur du GM-CSF

Le récepteur du GM-CSF permet la transduction des signaux de survie, de différenciation, de prolifération et d'activation initiés par le GM-CSF. La chaîne β est responsable de la transmission du signal, mais une délétion de la portion cytoplasmique de la chaîne α inhibe les signaux de prolifération et de survie engendrés par la liaison du GM-CSF sur son récepteur (Matsuguchi et al., 1997). Plus particulièrement, une délétion du domaine cytoplasmique de la chaîne α empêche l'activation de Jak2 (Doyle and Gasson, 1998). Les domaines responsables de chaque fonction sont assez bien connus (voir figure VI) (Smith et al., 1997). La portion proximale à la membrane régule le cycle cellulaire, la survie et la différenciation, alors que la portion distale transfère les signaux à la voie MAPK et régule l'adhésion et la migration.

La caractérisation du patron d'expression du récepteur du GM-CSF montre que ce dernier est retrouvé seulement chez les cellules myéloïdes. En effet, le criblage d'une série de lignée cellulaire révèle

que seules les lignées cellulaires dérivées de tumeurs myéloïdes (contrairement à celles dérivées de tumeurs lymphoïdes) expriment le récepteur du GM-CSF (Park et al., 1986). Cette observation a ensuite été confirmée par une étude réalisée dans des cellules primaires murines, où la chaîne α du récepteur n'est détectée que chez les précurseurs des macrophages et des granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) ainsi que chez les macrophages et granulocytes matures (Billia et al., 2001). Les autres types cellulaires testés (érythrocytes, mégacaryocytes, mastocytes, lymphocytes T et B) n'expriment pas ce récepteur.

Ces études montrent donc que le récepteur du GM-CSF joue un rôle important et spécifique chez les cellules hématopoïétiques de la lignée myéloïde.

6.3 Inactivation génique du récepteur du GM-CSF

L'inactivation génique du récepteur du GM-CSF a été réalisée. Les souris chez qui le gène codant pour la chaîne β (commune) a été inactivé présentent un phénotype très semblable à celles dépourvues de GM-CSF (Nishinakamura et al., 1995). Elles possèdent des anomalies au niveau pulmonaire qui ressemblent à la protéinose alvéolaire. La maladie est identique chez les deux types de souris. En plus de ce défaut, leur nombre d'éosinophiles est réduit. Cependant, elles ne montrent pas d'autres défauts hématopoïétiques. Comme la chaîne β est commune aux récepteurs de l'IL-3 et de l'IL-5, le nombre réduit d'éosinophiles pourrait être dû à un défaut de signalisation de l'IL-5. D'ailleurs, les souris dépourvues du gène de l'IL-5 ou de la chaîne α du récepteur à l'IL-5 présentent des niveaux réduits d'éosinophiles. L'inactivation génique de la chaîne β du récepteur rappelle donc en tous points celle de la cytokine.

6.4 Signalisation

Le GM-CSF induit plusieurs types de réponses cellulaires : la prolifération, la différenciation, la survie, ainsi que d'autres fonctions cellulaires. Son récepteur est donc couplé à plusieurs voies de signalisation qui agissent en parallèle afin d'effectuer les multiples commandes (Figure VII). Deux voies principales sont associées au récepteur du GM-CSF : la voie Jak-STAT (Quelle et al., 1994; Mui et al., 1995; Brizzi et al., 1996) et la voie MAPK (mitogen activated protein kinase) (Eder et al., 1993; Sato et al., 1993; Duronio et al., 1992). Cependant, l'action d'autres voies de signalisation n'est pas exclue puisqu'on sait qu'il existe plusieurs points de convergence (*cross-talk*) entre les différentes voies.

Le récepteur du GM-CSF comporte, dans la portion proximale au domaine transmembranaire, deux motifs appelés box1 et box2. Le domaine box1 est reconnu pour être un site de liaison à Jak2. Cette dernière peut alors phosphoryler différents résidus tyrosine en C-terminal du récepteur et aussi d'autres molécules de signalisation. Par exemple, Jak-2 peut phosphoryler les protéines nommées STAT (*signal transducers and activators of transcription*), qui s'associent au récepteur lorsque ce dernier est activé par son ligand. Une fois phosphorylées, ces protéines deviennent activées : elles se dissocient du récepteur et se dimérisent avant d'entrer dans le noyau et d'induire la transcription de leur gènes-cibles (Ihle, 1996).

En plus des boîtes 1 et 2, le récepteur du GM-CSF contient différents résidus tyrosine qui peuvent être phosphorylés, activant ainsi de multiples voies de signalisation. Par exemple, son interaction avec Shc, une protéine adaptatrice, permet de recruter Grb2, qui active alors Ras. L'activation de Ras conduit à l'activation des MAPK, qui induisent c-jun et c-fos (par exemple), conduisant ainsi la cellule à proliférer et à survivre (Rajotte et al., 1996).

7. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Le précurseur myéloïde, pour se différencier de façon terminale en macrophage, nécessite l'action de deux facteurs : un facteur intrinsèque, PU.1, et un facteur extrinsèque, le GM-CSF. Les objectifs de ce travail sont de vérifier si le GM-CSF et PU.1 agissent dans la même voie génétique, et plus particulièrement, d'examiner la possibilité que PU.1 agisse en aval du GM-CSF. Le GM-CSF engendre des signaux de survie, de différenciation, de prolifération et de fonctions cellulaires particulières. PU.1 agit-il en tant qu'effecteur du GM-CSF? Si oui, quels sont les signaux du GM-CSF qui convergent vers PU.1? Ces questions feront l'objet du travail ici présenté.

LÉGENDE DU TABLEAU

Tableau I. Gènes dont l'expression est régulée par PU.1.

PU.1 est un facteur de transcription exprimé seulement dans les lignées myéloïde et lymphoïde B. Par conséquent, ses gènes-cibles jouent des rôles importants au sein de ces deux lignées. On retrouve, parmi les gènes-cibles de PU.1, des gènes associés à la croissance (les récepteurs aux cytokines ou les cytokines elles-mêmes, comme le GM-CSFR ou l'IL-1 β , etc.) et des gènes associés à des fonctions cellulaires spécifiques (l'immunité via les immunoglobulines, la digestion cellulaire par le lysozyme et la myéloperoxidase, etc.) (Lloberas et al., 1999).

LÉGENDE DES FIGURES

Figure I. Hématopoïèse normale chez l'adulte.

Les cellules souches (HSC) peuvent être divisées en deux classes, soient les cellules dites à long terme (LT-HSC), qui peuvent s'auto-renouveler de manière indéfinie et les cellules dites à court terme (ST-HSC), qui ont un potentiel d'auto-renouvellement plus court. Ces dernières se différencient en progéniteurs multipotents, qui ne peuvent s'auto-renouveler mais peuvent donner naissance aux progéniteurs des lignées spécifiques (CMP et CLP). Les CLP se différencient progressivement en lymphocytes T, B et cellules NK alors que les CMP génèrent les GMP et les MEP qui engendrent les granulocytes / macrophages et les érythrocytes / mégacaryocytes, respectivement (adapté de (Reya et al., 2001)).

Figure II. Facteurs intrinsèques essentiels pour l'hématopoïèse normale.

Les facteurs de transcription AML-1, GATA-2, SCL et Bmi-1 sont essentiels pour la formation du tissu hématopoïétique et pour la formation des cellules souches. E2A, quant à lui, spécifie la lignée lymphoïde. PU.1 est responsable du développement de la lignée myéloïde alors que SCL et GATA-1 permettent la différenciation érythroïde (adapté de (Reya et al., 2001)).

Figure III. Facteurs extrinsèques essentiels pour l'hématopoïèse normale.

Les cytokines jouent un rôle important à tous les niveaux de différenciation hématopoïétique, mais, dans ce mémoire, leur importance est seulement soulignée dans les lignées myéloïdes et érythroïdes. Le GM-CSF permet la différenciation des précurseurs myéloïdes en granulocytes et en macrophages. Le M-CSF, quant à lui,

favorise le développement de la lignée monocyttaire, alors que le G-CSF permet la différenciation en granulocytes. Au niveau de la lignée érythroïde, l'EPO favorise le développement des érythrocytes (adapté de (Reya et al., 2001)).

Figure IV. La protéine PU.1 et ses domaines fonctionnels chez la souris.

La protéine PU.1 est composée de 4 domaines fonctionnels : un domaine riche en acides aminés acides, un domaine riche en glutamine, un domaine PEST et un domaine ETS. Ces domaines permettent à la protéine de transactiver un promoteur, de s'associer à d'autres protéines ou à l'ADN et lui confèrent sa stabilité en régulant sa dégradation protéolytique.

Figure V. Les effets du GM-CSF.

Le GM-CSF est une cytokine qui joue plusieurs rôles au niveau des cellules myéloïdes. Elle permet d'abord la différenciation en granulocytes et en macrophages. Elle est aussi impliquée dans l'augmentation de la prolifération de ces cellules. De plus, le GM-CSF diminue l'apoptose chez une population de précurseurs. Enfin, le GM-CSF permet aux cellules myéloïdes de jouer leur rôle de phagocytes et de cellules immunitaires en stimulant la phagocytose, l'adhésion et l'activation par des pathogènes.

Figure VI. Structure du récepteur du GM-CSF.

Le récepteur du GM-CSF est constitué de 2 chaînes : une chaîne α , responsable de la liaison spécifique au ligand et en partie de la transmission du signal, et une chaîne β , responsable de l'induction de la majorité des effets du GM-CSF : la différenciation, la survie, la prolifération, la division cellulaire, l'activité migratoire et l'activation de la voie MAPK.

Figure VII. Voies de signalisation activées par le récepteur du GM-CSF. La transmission du signal se fait principalement via la chaîne β . D'une part, celle-ci peut recruter, via sa boîte 1, Jak-2, qui peut alors phosphoryler STAT-5. Ce dernier transloque au noyau et active la transcription de plusieurs gènes cibles, notamment c-Fos et c-Myc. D'autre part, la chaîne β peut aussi s'associer à SHC/SHP1/PI3K via ses tyrosines et activer Ras, qui active à son tour une MAPK. La transcription de gènes-cibles comme c-Fos est alors activée.

TABLEAU

Tableau I. Gènes dont l'expression est régulée par PU.1.

Gène	Description
Chaînes légères: λ et κ	Immunoglobuline
Chaîne lourde: μ	Immunoglobuline
Chaîne J	Immunoglobuline
MB1	Protéine membranaire, immunoglobuline
Fc γ RI	Immunoglobuline, récepteur
Fc γ RIIIa	Immunoglobuline, récepteur
CR3 (CD11b/CD18)	Protéine du complément, récepteur
CR4 (CD11c/CD18)	Protéine du complément, récepteur
GM-CSFR	Récepteur d'un facteur de croissance
G-CSFR	Récepteur d'un facteur de croissance
M-CSFR	Récepteur d'un facteur de croissance
Récepteur scavenger: type I et II	Récepteur
Récepteur mannose	Récepteur
LFA-1 (CD11a/CD18)	Protéine de surface
CD72	Protéine de surface
CD20	Protéine de surface
Macrosialine	Protéine de surface
IL-1 β	Cytokine
MIP-1 α	Cytokine
TNF- α	Cytokine
IL-1ra	Cytokine
Btk	Kinase
Protéinase-3	Enzyme
Élastase	Enzyme
Cathepsine G	Enzyme
Lysozyme	Enzyme
Gélatinase	Enzyme
Myéloperoxidase	Enzyme
gp91(phox)	Enzyme
p47(phox)	Enzyme
RNS2	Enzyme
MHC classe II-chaîne A β	Complexe d'histocompatibilité majeur
c-fes	Proto-oncogène
c-rel	Proto-oncogène

FIGURES

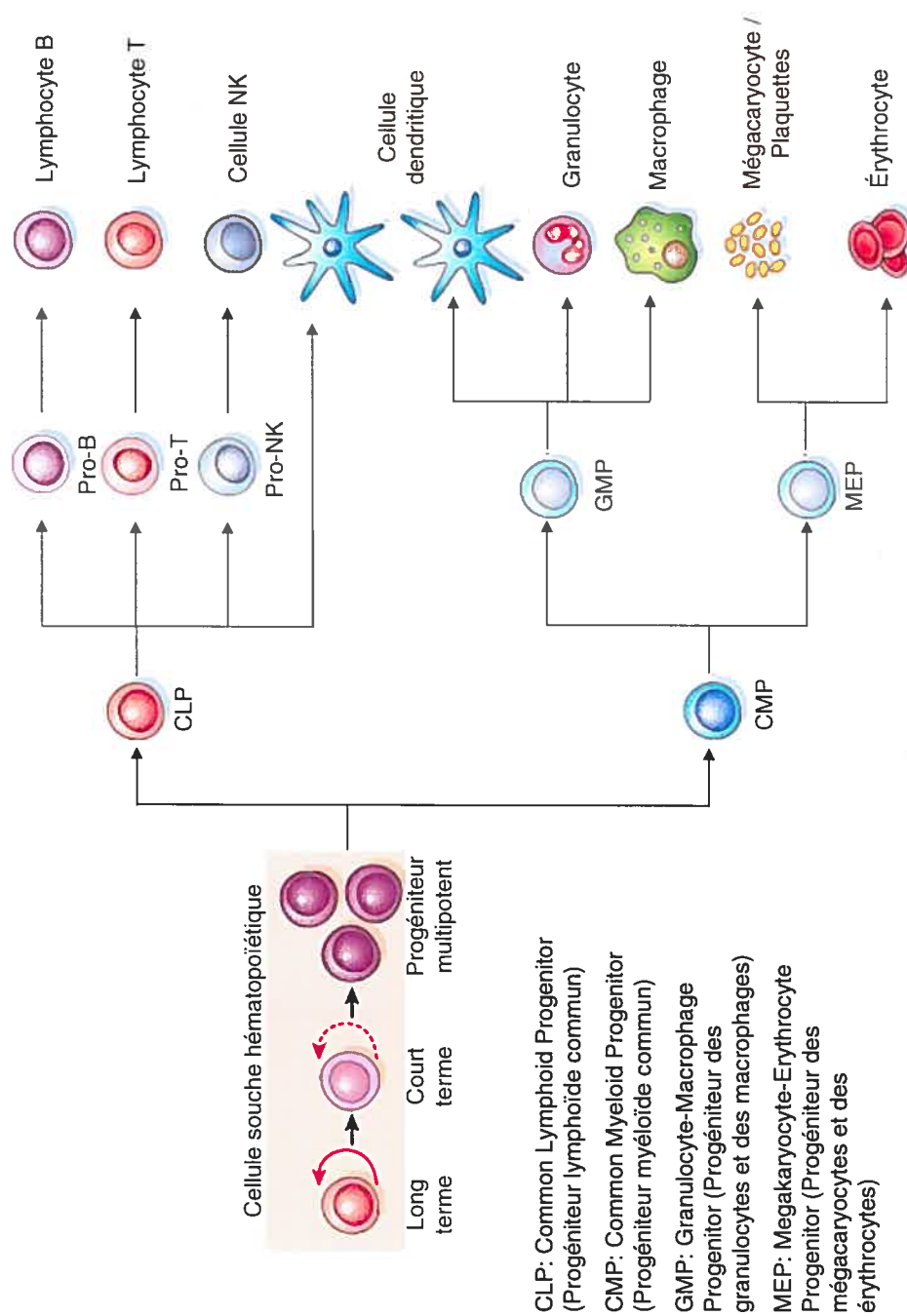


Figure 1. Hématopoïèse normale chez l'adulte.

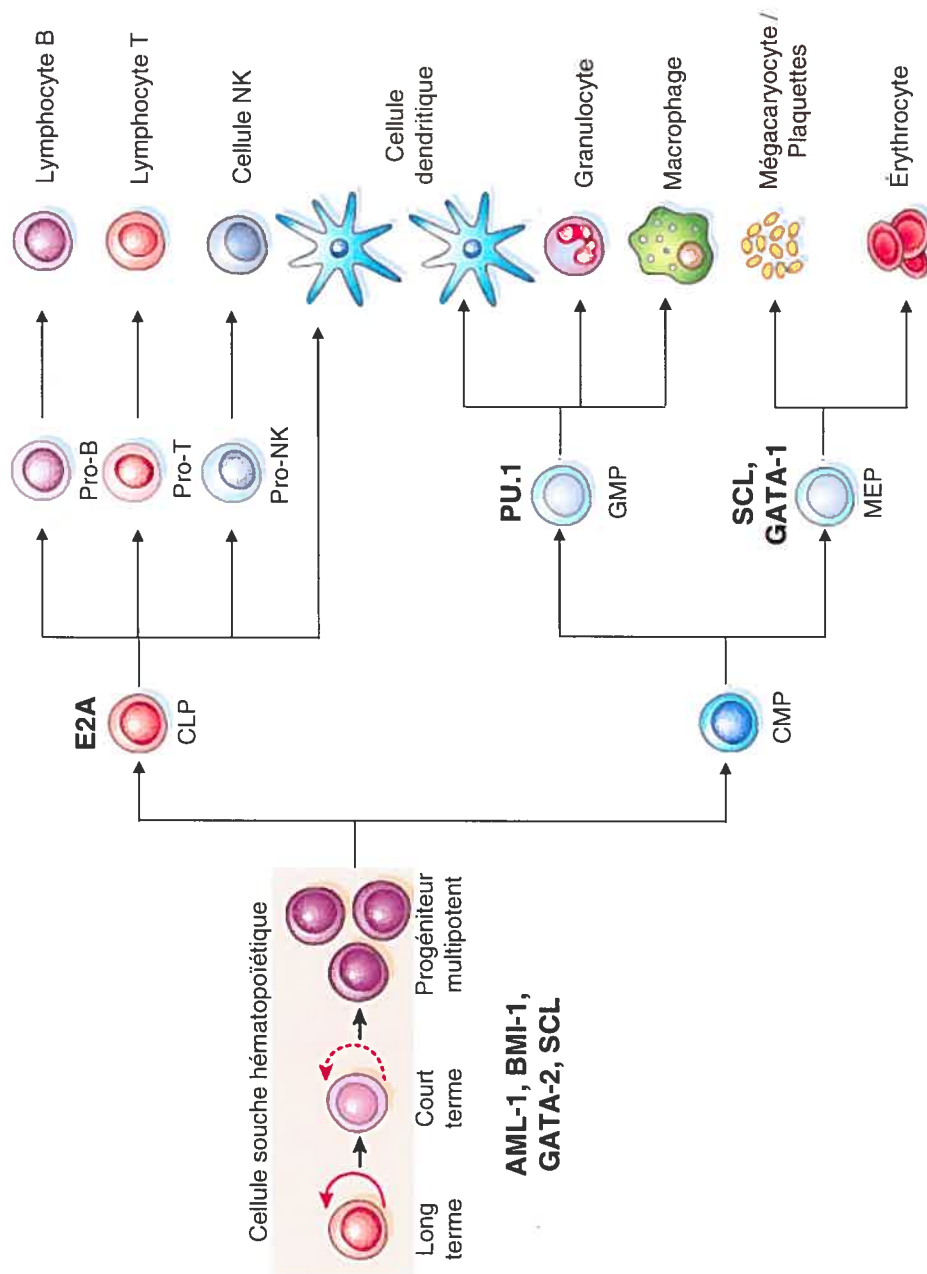


Figure II. Facteurs intrinsèques essentiels pour l'hématopoïèse normale.

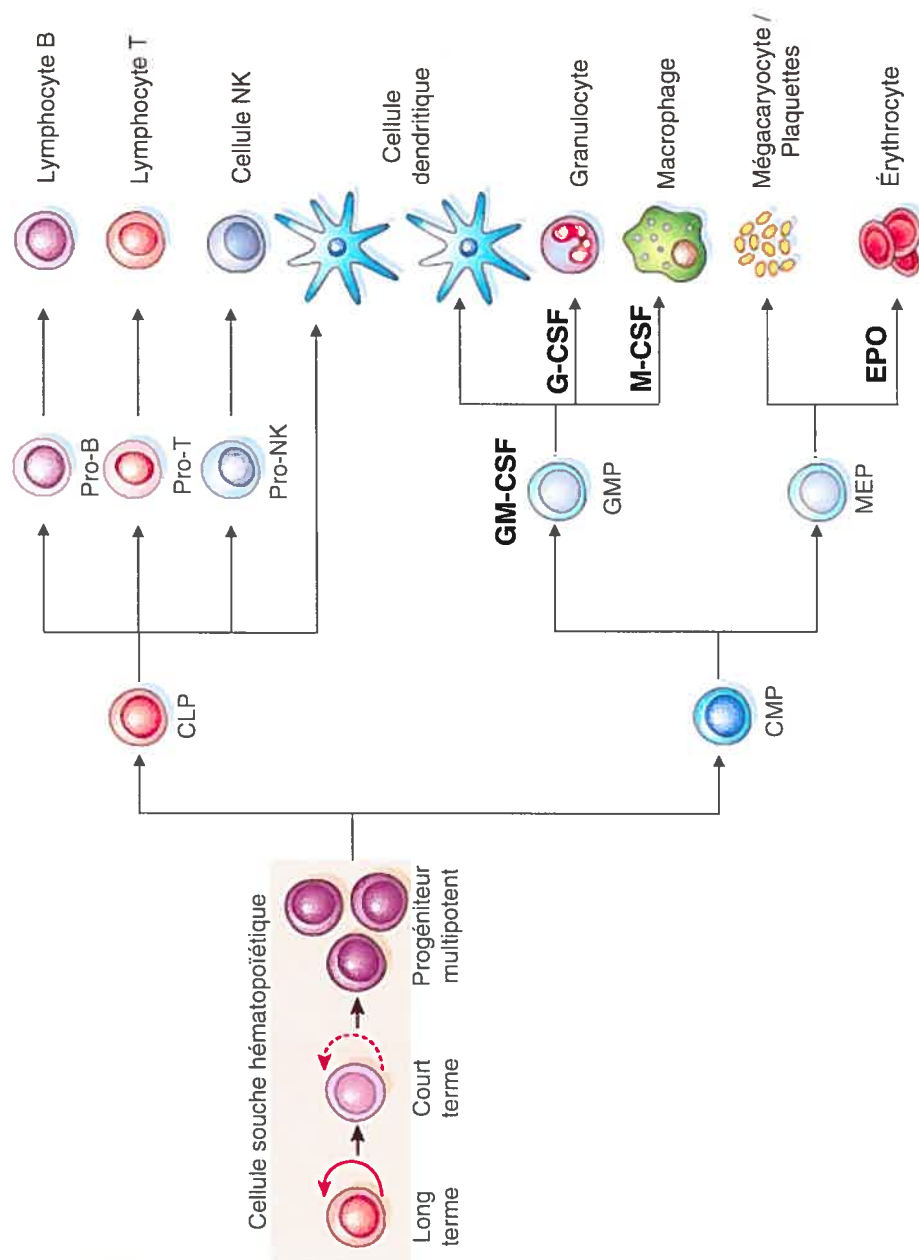


Figure III. Facteurs extrinsèques essentiels pour l'hématopoïèse normale.

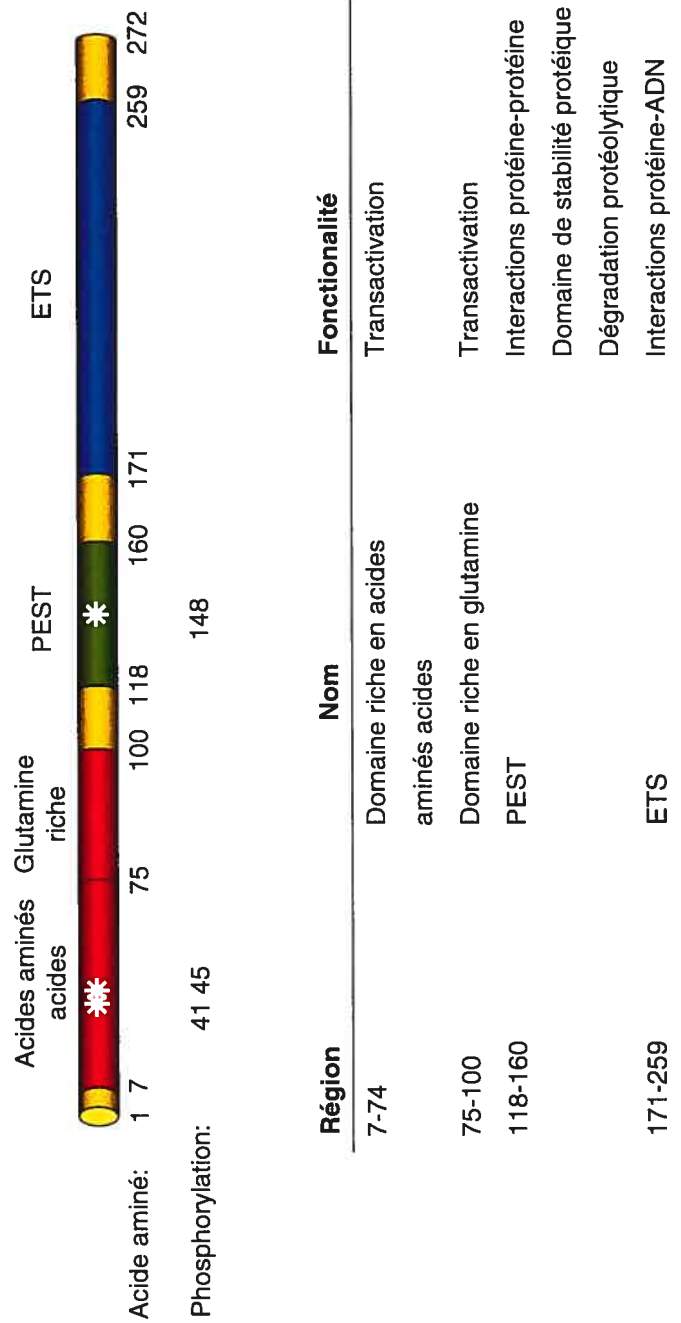


Figure IV. La protéine PU.1 et ses domaines fonctionnels chez la souris.

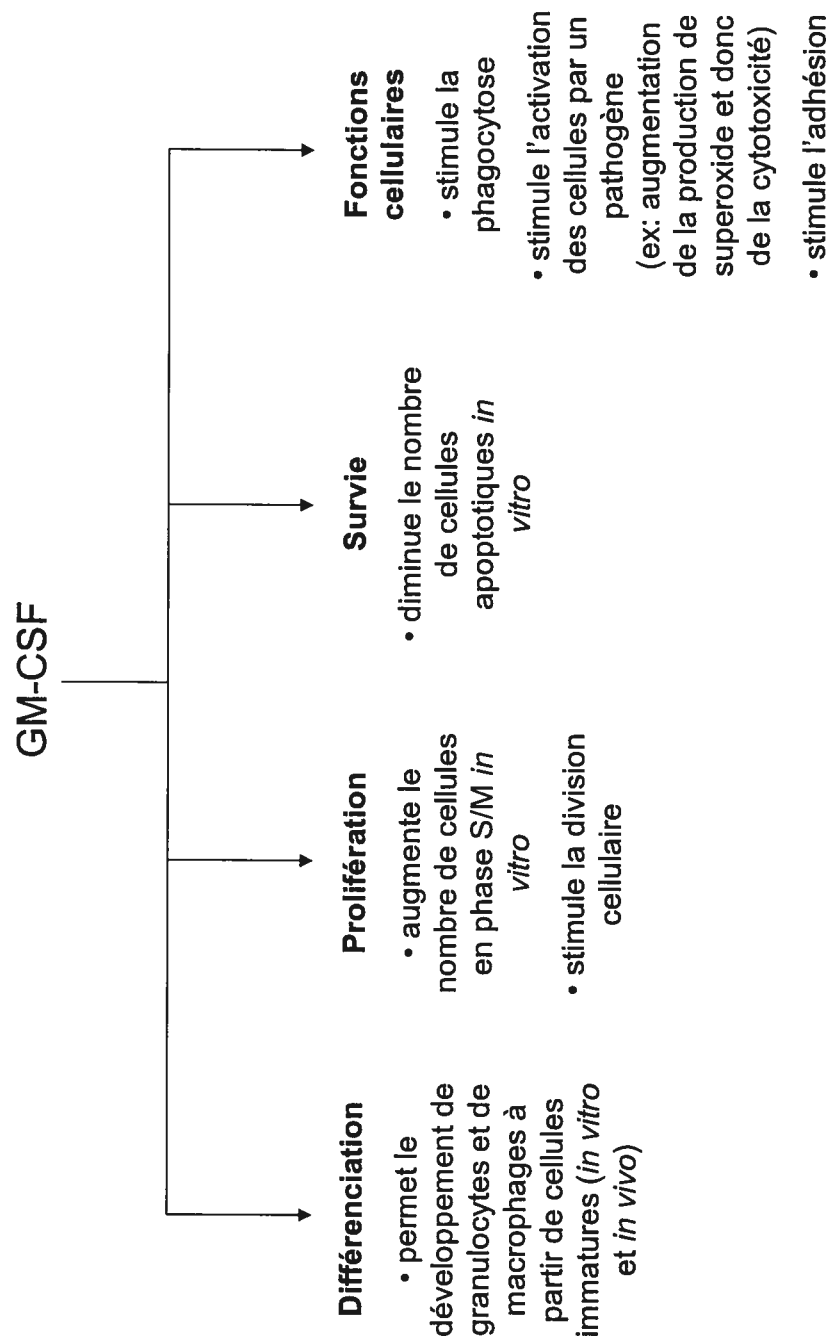


Figure V. Les effets du GM-CSF.

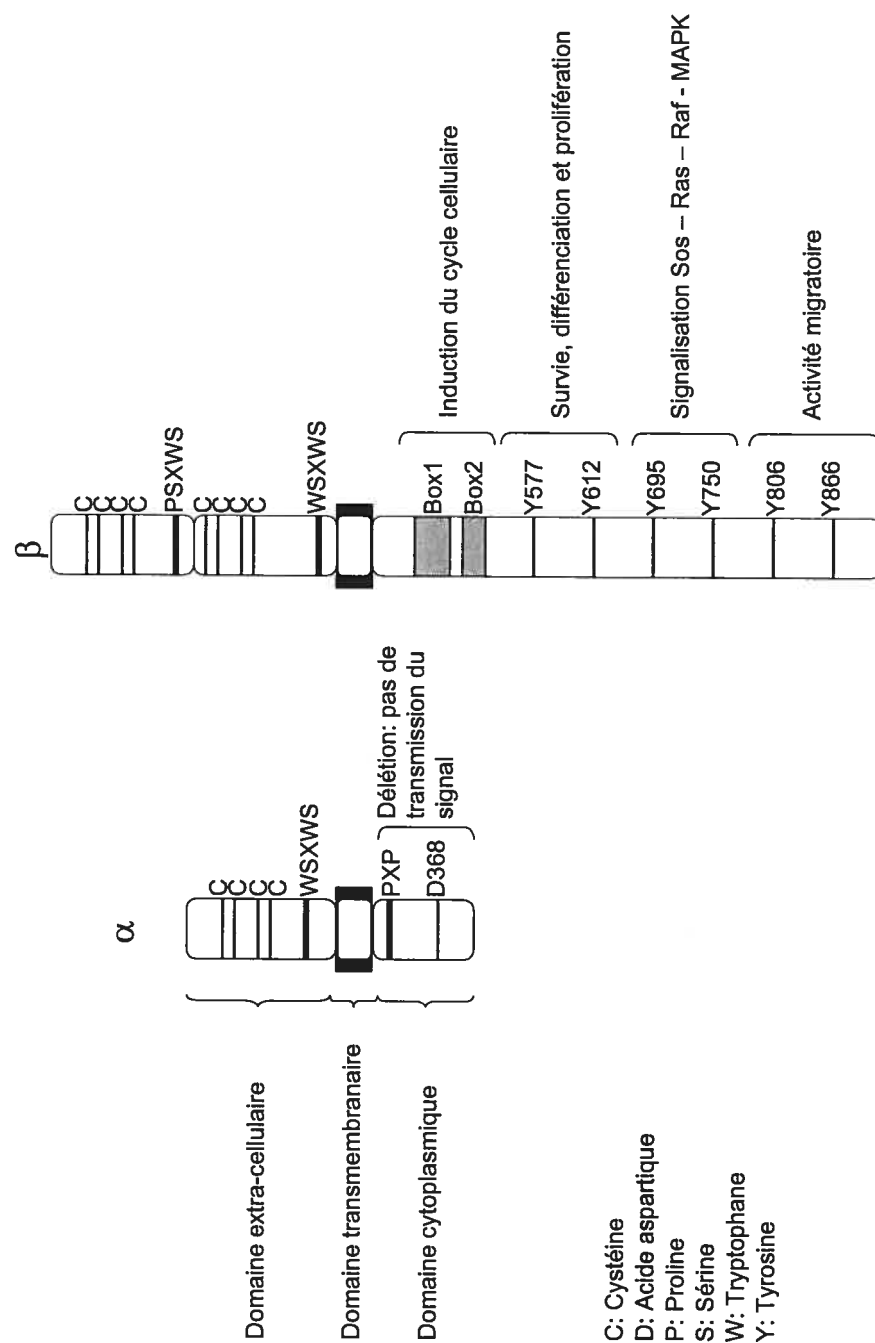


Figure VI. Structure du récepteur du GM-CSF.

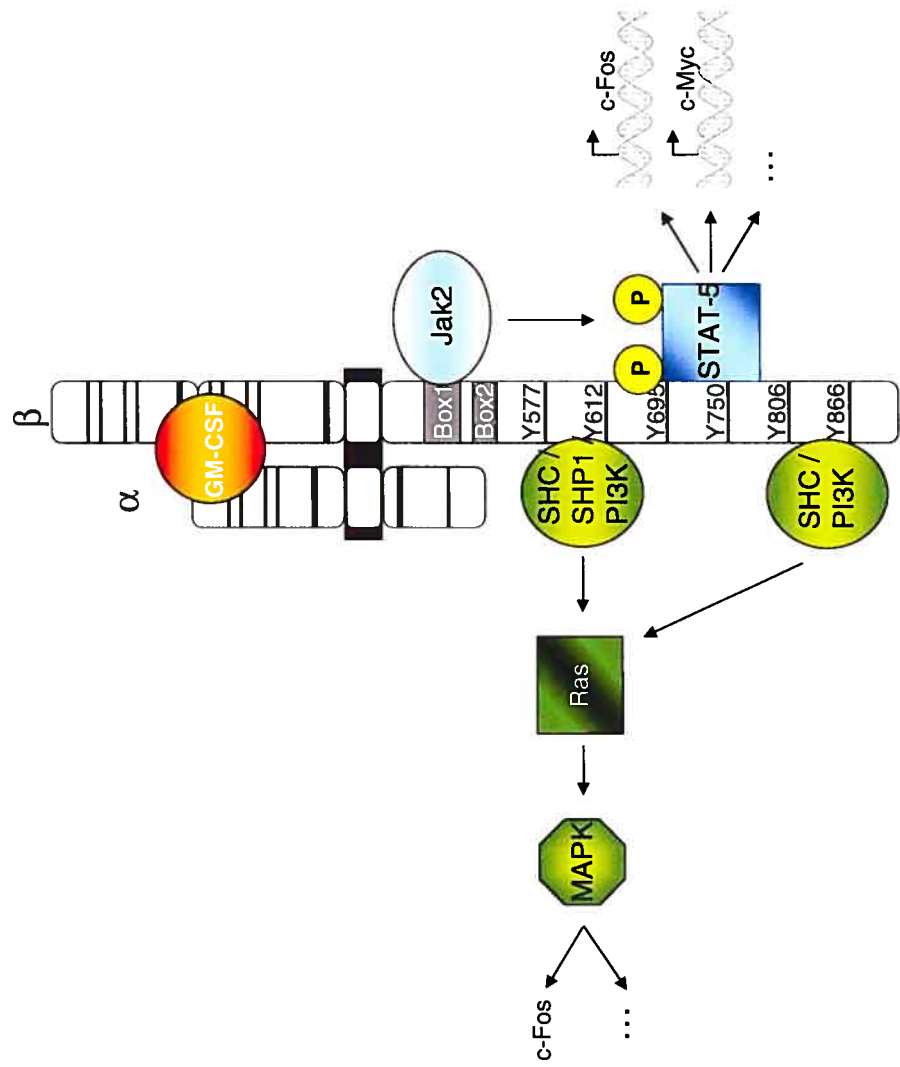


Figure VII. Voies de signalisation activées par le récepteur du GM-CSF.

CHAPITRE 2 : PRÉSENTATION DU MANUSCRIT

INTERACTION BETWEEN PU.1 AND GM-CSF IN THE SURVIVAL OF
GRANULOCYTE AND MACROPHAGE PROGENITORS

Marianne St-Denis, André Haman, Nicolas Duceppe, Mathieu
Tremblay, Sabine Herblot, Trang Hoang

Institute of Research in Immunovirology and Cancer, Department of
Pharmacology and Molecular Biology Program, University of Montreal.

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for
Health Research (TH), studentships from the Fonds de la Recherche en
Santé du Québec (M.S.D. and M.T.) and a post-doctoral award from the
Leukemia Research Fund of Canada (S.H.).

RUNNING TITLE: GM-CSF and PU.1 interact to support myeloid cell
survival

Correspondance to:

Trang Hoang

Institute of Research in Immunovirology and Cancer (IRIC)
University of Montreal
P.O. Box 6128, Downtown Station
Montreal, Quebec H3C 3J7
Tel.: (514) 343-6970
Fax : (514) 343-6945
[REDACTED]

ABSTRACT

PU.1, a transcription factor of the ets family, drives the development of myeloid cells while the role of cytokines in this process remains to be clarified. Here we show that GM-CSF upregulates the expression of *PU.1*, of *Mcl-1* and of *A1*, two anti-apoptotic genes, in purified granulocyte and macrophage progenitors (GMPs). Furthermore, we provide functional evidence for a genetic pathway involving GM-CSF, PU.1 and *Mcl-1* / *A1*, shown here to be direct PU.1 target genes by chromatin immunoprecipitation. Retroviral mediated delivery of an anti-sense PU.1 into primary bone marrow cells specifically disrupts PU.1 protein levels, *Mcl-1* and *A1* mRNA levels and prevents the anti-apoptotic effect of GM-CSF. We therefore conclude that GM-CSF consolidates the myeloid fate through an up-regulation of PU.1 that favors myeloid cell survival and the myeloid differentiation program.

INTRODUCTION

Blood cells are generated through a developmental cascade initiated by the commitment of a multipotent precursor into specific lineages, followed by transition through developmental intermediates and final maturation. There is increasing evidence for an important role for transcription factors in controlling the process of hematopoietic cell differentiation. This process is currently believed to be unidirectional, consistent with a role for lineage specific transcription factors in directing commitment into one or more than one lineages. In contrast, extrinsic regulation by environmental factors remains controversial, mainly because of the inevitable coupling between apparent commitment and selective survival secured by hematopoietic growth factors. For example, exposure of primary CD34⁺ cells (Caceres-Cortes et al., 2001) and of the multipotent cell line FDCP-Mix (Just et al., 1991) to GM-CSF results in synchronous granulocyte and macrophage differentiation. However, ectopic expression of Bcl-2 in the same cell permits survival in the absence of trophic factors, together with spontaneous multilineage differentiation (Fairbairn et al., 1993). It was therefore suggested that growth factors are permissive, rather than instructive for lineage commitment. Nonetheless, it remains to be documented whether hematopoietic growth factors may favor cell differentiation through a modulation of lineage specific transcription factors.

PU.1, a monocytic/B lymphoid transcription factor of the *ets* family, was discovered as a common site of retroviral integration in Friend erythroleukemia, and as a protein that binds the purine-rich lymphoid-specific enhancer GAGGAA. PU.1 regulates most macrophage and granulocyte-specific genes. An essential role for PU.1 in the generation of neutrophils and of monocytes was shown through homologous

recombination, as *PU.1*^{-/-} mice succumb to infections a few days after birth, due to the lack of functional phagocytes while another mutation caused pre-natal death (Scott et al., 1994; McKercher et al., 1996). These observations, combined with the fact that PU.1 is autoregulatory, suggest that PU.1 may act as a central regulatory gene for the monocyte lineage (Nerlov and Graf, 1998; DeKoter et al., 1998; Tenen et al., 1997). *PU.1*^{-/-} mice also present with lymphoid deficiencies. There is evidence to support the concept that stem cells express multiple lineage markers (Hu et al., 1997), suggesting that lineages are in competition in multipotent cells. As a corollary, lineage selection occurs through upregulation of appropriate lineage specific programs and concurrent downregulation of genes involved in the development of other lineages. In support of this hypothesis are the observations that enforced expression of GATA-1, an erythroid zinc finger transcription factor, can reprogram chicken myelo-monocytic cells to the thrombo-erythroid pathway while suppressing myeloid differentiation (Kulesa et al., 1995). Similarly, PU.1 induces myeloid differentiation (Nerlov and Graf, 1998; Moreau-Gachelin et al., 1996) arguing for a competitive relationship of lineages.

GM-CSF is a multifunctional growth factor (reviewed by (Metcalf, 1993)) that stimulates the proliferation of hemopoietic and vascular endothelial cells. Moreover, GM-CSF suppresses apoptosis in hemopoietic precursors (Williams et al., 1990; Rajotte et al., 1992) while enhancing the response of neutrophils to bacterial antigens and the phagocytic activity of macrophages/monocytes (reviewed by (Gasson, 1991)). A large number of cytokines have been assessed for their therapeutic potential in anti-tumor immunity. Among these, GM-CSF was clearly the most potent and long lasting inducer of an anti-tumoral response *in vivo* (Dranoff et al., 1993), most likely due to its multifunctional properties in hemopoietic progenitors, specifically its unique ability to

promote the differentiation of hemopoietic progenitors into macrophages (Smith et al., 1997) and dendritic cells (Pardoll, 1995), as well as its capacity to directly enhance the function of antigen presenting cells (Heufler et al., 1988; Sallusto and Lanzavecchia, 1994) and thus elicit specific immune response and tumoricidal activity. Indeed, exposure of the multipotent cell line FDCP-Mix to GM-CSF results in synchronized granulocyte macrophage differentiation, which was confirmed through GM-CSF gene transfer (Just et al., 1991). These results are in agreement with our observations that GM-CSF favors the emergence of granulocytes and macrophages in purified CD34⁺ cells (Caceres-Cortes et al., 2001). Finally, GM-CSF is endowed with the capacity to induce the differentiation of common lymphoid progenitors (CLP) along the myeloid lineage, on ectopic expression of the GM-CSF receptor in these cells (King et al., 2002).

Evidence that external stimuli can influence tissue specific transcription are far and few in between. Estrogens induce anemia *in vivo*, and inhibits erythroid progenitors *in vitro*. It has been shown that ligand-bound estrogen receptors sequester GATA-1 in an inactive complex and inhibit GATA-1-dependent transcription (Blobel and Orkin, 1996). Furthermore, PU.1 function is required for signalling through the B cell receptor (Garrett-Sinha et al., 1999). Recent evidence also suggests that the G-CSF receptor induces granulocyte differentiation through activation of C/EBP ϵ (Nakajima and Ihle, 2001) and C/EBP α , thus altering the ratio of C/EBP versus PU.1 and favoring the granulocyte lineage (Dahl et al., 2003). Finally, GM-CSF enhances phagocytosis in macrophages through PU.1 (Shibata et al., 2001). In the present study, we addressed the question whether the multiple functions of GM-CSF on granulocyte macrophage precursors are mediated by PU.1.

RESULTS

GM-CSF upregulates PU.1 and Mcl-1 in myeloid progenitors

Hematopoietic progenitors were purified into three subpopulations as described (Traver et al., 2001), common myeloid progenitors (CMP), granulocyte/monocyte progenitors (GMP) and megakaryocyte/erythroid progenitors (MEP) (Figure 1A). The purity of these populations was independently confirmed by colony assays (data shown next to histogram, Figure 1A) and by semi-quantitative PCR analysis revealing the specific expression of PU.1 in GMPs and CMPs (Figure 1B), as reported (Akashi et al., 2000). These cells were exposed to GM-CSF, or a mixture of SF, FLT3-L and IL-11, shown previously to maintain stem cell function (Trevisan et al., 1996). As shown in Figure 1C, GMP proliferated vigorously and continuously in response to GM-CSF, while MEP failed to do so and did not survive beyond one day of exposure to GM-CSF. This is not surprising, since MEPs do not express the GM-CSF receptor (Figure 1B). In comparison, CMP showed a more modest response to GM-CSF as cell numbers doubled on day 2 and remained constant or decreased thereafter. When these three populations of purified progenitors were stimulated with a mixture of SF, FLT3-L and IL-11, cell numbers increased five-fold on the first day of culture, but differed afterwards. MEP continued to proliferate while CMP remained constant or decreased slightly. In contrast, GMP cultures were exhausted on day 3, in sharp opposition to the vigorous proliferation triggered by GM-CSF. Together, the results indicate that the response of GMP to these cytokines was the exact opposite of MEP, and that GMP showed the strongest response to GM-CSF, consistent with their myeloid nature.

To determine the basis for differential responsiveness to GM-CSF between the different populations of hematopoietic progenitors, we

analysed gene expression through semi-quantitative RT-PCR analysis. We chose to assay PU.1 and several members of the Bcl-2 family, Mcl-1, A1 and Bcl-xL levels for two reasons. Abrogation of GM-CSF signalling *in vivo* is associated with lower PU.1 levels in peritoneal macrophages (Shibata et al., 2001). Furthermore, Mcl-1, A1 and Bcl-X_L were all previously shown to be induced by various cytokines (Chao et al., 1998; Socolovsky et al., 1999). As shown in Figure 1B, GMP showed the highest expression level for PU.1, A1 and Mcl-1 prior to culture, while GATA-1 and Bcl-XL were lowest. GM-CSF stimulation further increased PU.1, A1 and Mcl-1 in GMP, and the kinetics of induction for these genes were comparable, as their expression levels were induced on day 1 and increased over the 3-day culture period, except for A1 that was strongly induced (50 fold) and reached a peak on day 2 (Figure 1D). These three genes were also induced by GM-CSF in CMP, albeit to lower levels, but not in MEP and these inductions correlated with the lower proliferative response of CMPs to GM-CSF and the lack of biological response in MEP. In contrast to Mcl-1 and A1, Bcl-X_L was not induced by GM-CSF stimulation in any cell type while it was strongly induced by the early acting cytokines in MEP, correlating with their growth response in culture. Together, our observations revealed a strong correlation between cell growth in response to GM-CSF and the induction of PU.1, A1 and Mcl-1 in target populations.

***Mcl-1* and *A1* as PU.1 target genes in primary myeloid cells**

This possibility was directly addressed through chromatin immunoprecipitation of 32D myeloid cells. Exposure to G-CSF for 24h up-regulates PU.1 mRNA and protein levels (Figure 1A), without inducing cell differentiation (Figure 1B), as assessed by morphological criteria and the absence of CD11b expression. This resulted

nonetheless in an upregulation of the two chains of the GM-CSF receptor (shown for GMR α , Figure 1C), allowing for cell survival and differentiation in response to GM-CSF (Figure 1B) as reported (Bigas et al., 1998), correlating with a further up-regulation of PU.1 mRNA and more strikingly, of PU.1 protein levels (Figure 1A). Interestingly, G-CSF upregulated Mcl-1 but not A1 gene expression, while exposure to GM-CSF resulted in a three fold increase in Mcl-1 and a 60-fold induction of A1 (Figure 2C), exactly as observed in GMP. We therefore performed chromatin immunoprecipitation and compared the occupancy of the *Mcl-1* and A1 loci by PU.1 when these 32D cells were maintained with IL-3, or switched to G-CSF and GM-CSF-containing media, sequentially. As shown in Figure 2D, PU.1 was present on both promoters *in vivo*, in undifferentiated cells. G-CSF stimulation induced a 10-fold and 2-fold increase in PU.1 occupation of the A1 and *Mcl-1* loci, respectively, as compared to IL-3 stimulated cells. Finally, GM-CSF further increased PU.1 occupancy of these two loci by 15-fold and 20-fold, respectively. Finally, a region of inactive chromatin (c-kit 13500) was amplified as a control in input chromatin, and was absent in all immunoprecipitated chromatin, confirming the specificity of the procedure. Similarly, the anti-PU.1 did not bring down *HPRT* promoter sequences. Together, our data indicate that *Mcl-1* and A1 are direct PU.1 target genes in immature myeloid cells and that GM-CSF stimulation increased PU.1 occupancy of these loci. Together, our study provides evidence for a genetic pathway that involves GM-CSF and the subsequent up-regulation of PU.1 as well as two target genes, *Mcl-1* and A1 in the survival of immature myeloid cells.

Decreasing PU.1 protein levels prevents the anti-apoptotic effect of GM-CSF in myeloid cells

To determine the importance of PU.1 in the response to GM-CSF, we delivered an anti-sense PU.1 via retroviral-mediated gene transfer in 5-FU bone marrow cells. As shown in Figure 3C, the anti-sense PU.1 decreased PU.1 protein levels in these cells. The consequence of decreased PU.1 levels in the response of hematopoietic progenitors to GM-CSF was therefore monitored through several approaches.

First, bone marrow cells expressing the MSCV control vector or the AS-PU.1 vector were plated in the presence of GM-CSF or IL-11 and Steel Factor, and analysed by flow cytometry for CD11b expression and Annexin V immediately after the infection protocol, or 24 h later. As shown in Figure 3A, in cultures stimulated with early acting cytokines, CD11b, a PU.1 target gene, was significantly decreased when PU.1 levels were lowered. There was a striking difference between GM-CSF stimulated control cells (MSCV) or AS-PU.1 expressing cells (Figure 3A). While most control cells were viable in GM-CSF cultures, a majority of CD11b⁺ cells expressing AS-PU.1 were apoptotic, as revealed by Annexin V labelling. Interestingly, these cells were still able to transiently upregulate CD11b when exposed to GM-CSF (Figure 3A), as the proportion of CD11b⁺ cells increased from 22% to 68% when AS-PU.1 expressing cells were plated in SF and IL-11-containing medium or a GM-CSF-containing medium, respectively. However, when cells were analyzed one or two days later, past the peak of apoptotic death, CD11b⁺ cells were drastically decreased in AS-PU.1 treated cells as compared to controls (data not shown and Figure 3B). Thus, our early kinetic analysis of cells in culture allowed us to catch CD11b⁺ cells in the process of dying.

To rule out the possibility that apoptosis was either enhanced or indirectly caused by the neomycin selection, we repeated the retroviral

gene transfer procedure with the GFP marker. This analysis confirmed that the AS-PU1 caused apoptotic death in the CD11b⁺ population (Figure 3B) as well as a decrease in CD11b expression (Figures 3B and 3D). RT-PCR analysis revealed that the expression of Mcl-1 was severely impaired in AS-PU.1 cells, when normalized to S16 controls (Figure 3D). Expression of the GM-CSF receptor β c, a PU.1 target gene, was also reduced (Figure 3D), which could contribute in part to cell death. Together, these observations suggest that PU.1 is an essential downstream component of GM-CSF signalling in myeloid cells that coordinates the expression of myeloid-specific genes and cell survival genes.

To further confirm the importance of PU.1 for the expression of A1 and Mcl1, we performed quantitative RT-PCR analyses of fetal liver cells taken from PU.1^{-/-} mice. These cells were able to proliferate in culture in the presence of IL-3 and SF. Data shown in Figure 4 indicated that all five PU.1 target genes tested were induced by these cytokines, CD11b, GMR α , A1 and Mcl-1 while Bcl-XL, an Epo-response gene, was not induced in culture. Furthermore, PU.1 function is essential for this induction for 4 out of 5 genes, A1, Mcl-1, CD11b and GMR α , while PU.1 was redundant for the induction of GMR β and for Bcl-XL (Figure 4). This experiment concurs with the above observations to show that the antiapoptotic genes A1 and Mcl-1 are PU.1 target genes. Finally, despite the expression of both GMR α and GMR β in cultured PU.1^{-/-} cells, these cells fail to respond to GM-CSF (data not shown) (DeKoter et al., 1998).

PU.1 is specifically required for the response of myeloid progenitors to GM-CSF-dependent survival cue

The consequences of decreased PU.1 levels on hematopoietic progenitors were further tested in purified GMPs, and in functional assays in methylcellulose cultures. As shown in Figure 5 A and B, control GMPs expressing the empty MSCV vector survived readily when exposed GM-CSF. In contrast, there was a high degree of apoptosis in GMPs expressing AS-PU.1. In these cultures, there was a four to five fold increase in apoptosis as compared to control cultures. In contrast to GMPs, MEPs were unaffected when PU.1 levels were decreased compared to control cells expressing the empty vector.

We next assessed the capacity of CFU-GM to respond to GM-CSF in culture, in which 5-FU bone marrow cells were pre-stimulated with SF and IL-3 or with GM-CSF as a single cytokine for 24h, followed by plating in methylcellulose in the presence of SF and IL-3, or GM-CSF (Figure 6A). When cultures were exposed to IL-3/SF and replated with the same combination of growth factors, colony formation from control cells expressing the empty MSCV vector or cells expressing the anti-sense PU.1 was comparable (Figure 6A). In contrast, lowering PU.1 levels significantly affected cultures pre-stimulated with GM-CSF, and then replated in GM-CSF or IL-3/SF containing conditions, as the anti-sense PU.1 prevents colony formation stimulated by GM-CSF when compared to control cells (MSCV). Furthermore, a 24h exposure to GM-CSF was sufficient to cause lethality, as colony formation could not be rescued by IL-3/SF in methylcellulose culture. Comparable results were observed with GFP as a selectable marker, instead of neomycin resistance (data not shown). Together, our observations indicate that PU.1 is specifically required for colony formation supported by GM-CSF, consistent with previous work (DeKoter et al., 1998; Hohaus et al., 1995).

GM-CSF is a pathway which is commonly activated in acute myeloblastic leukemia (AML) (Rodriguez-Cimadevilla et al., 1990; Irish et al., 2004). We therefore interrogated the gene profiling data set published by Golub et al (Golub et al., 1999) and found that PU.1 was highest in leukemic samples from AML patients, as compared to samples from patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (T or B-ALL) (Figure 7). Furthermore, both *A1* and *Mcl-1* were highest in the AML samples, and their expression levels were highly correlated with those of PU.1 ($r=0.7-0.75$). In contrast, *Bcl2* expression was low and although *Bcl-XL* was more heterogenous, neither of the two genes showed any correlation with PU.1 levels ($r=0$). These results are consistent with the view that *A1* and *Mcl-1* are PU.1 target genes while *Bcl-2* and *Bcl-XL* are not, and that AML is associated with high PU.1 levels.

DISCUSSION

A genetic pathway involving the GM-CSF receptor, PU.1 and *Mcl-1*

In the present study, we provide evidence indicating that PU.1 functions downstream of the GM-CSF receptor and identify *Mcl-1* and *A1* as novel PU.1 target genes in primary hematopoietic progenitors. We show that GM-CSF stimulation upregulates PU.1 levels and PU.1 target genes in GMPs, i.e. *CD11b*, *A1* and *Mcl-1*. Furthermore, an antisense PU.1 prevents cell survival as well as the induction of *CD11b*, *A1* and *Mcl-1* by GM-CSF. Third, GM-CSF increases the occupancy of the *A1* and *Mcl-1* promoters by PU.1 in chromatin. Together, our observations

delineate a pathway through which information flows from the GM-CSF receptor to PU.1 and the anti-apoptotic genes *A1* and *Mcl-1*, and favors an expansion of the myeloid lineage.

Cell differentiation and cell survival are intricate processes during normal development (reviewed by (Linette and Korsmeyer, 1994)). Thus, GATA-1 gene ablation blocks erythroid differentiation at the proerythroblast stage *in vivo*, resulting in apoptotic death when the cells are induced to undergo erythroid differentiation *in vitro* (Weiss and Orkin, 1995). Similarly, PU.1 is required for macrophage development *in vivo* (Scott et al., 1994; Scott et al., 1997) and for macrophage activation by GM-CSF (Shibata et al., 2001). Here we show that PU.1 is also essential for the survival of myeloid cells, via *A1* and *Mcl-1*.

Previous work has identified the α and β chains of the GM-CSF receptor as PU.1 target genes (DeKoter et al., 1998; Hohaus et al., 1995), although both genes were still expressed in *PU.1*-deficient cells. These results suggest that PU.1 regulates myeloid cell survival via the activation of cytokine receptors. However, ectopic expression of the GM-CSF receptor in *PU.1*-deficient cells did not rescue myeloid development (Anderson et al., 1999), consistent with our finding that PU.1 function is also an essential mediator of GM-CSF signalling. Furthermore, we show that PU.1 determines the myeloid fate not only through the activation of myeloid specific genes that include *CD11b*, but also through direct activation of anti-apoptotic genes such as *A1* and *Mcl-1*, providing molecular evidence that a single transcriptional regulator drives both cell survival and cell differentiation.

Hematopoietic cells require constant signalling from the environment to suppress a default pathway of cell death. It is therefore not surprising that important lineage regulators also specify the expression of growth factor receptors that govern cell survival. Recent evidence suggests, however, that these transcriptional regulators also fulfill an essential

anti-apoptotic function downstream of receptor signalling. For example, Flk1, a tyrosine kinase receptor that is important at the onset of hematopoiesis is a target gene of the SCL transcription factor (Kappel et al., 2000). However, decreased flk-1 signaling causes a decrease in SCL expression and conversely, a gain of function of SCL is sufficient to rescue apoptosis in primitive erythroid cells caused by a hypomorphic VEGF allele (Martin et al., 2004), suggesting a genetic pathway from Flk1 and possibly other receptors (Liao et al., 2002) to SCL. Similarly, C/EBP α drives the expression of the G-CSF receptor (Zhang et al., 1997) and G-CSF has been shown to favor granulocyte differentiation via an upregulation of C/EBP α (Dahl et al., 2003). Finally, PU.1 enhances the expression of the GM-CSF receptor (Nerlov and Graf, 1998; DeKoter et al., 1998; Tenen et al., 1997) and GM-CSF signalling upregulates PU.1 to favor macrophage differentiation (shown here and (Shibata et al., 2001)). We therefore propose that a positive feedback loop between important lineage transcription factors and growth factor receptors consolidate cell fate, i.e. cell survival and lineage choice, in the hematopoietic system.

Cytokine signaling and cell fate

Graded PU.1 levels drive the macrophage versus B lymphocyte (DeKoter and Singh, 2000) or versus neutrophil lineage choice (Dahl et al., 2003). The possibility that extrinsic factors can modulate PU.1 levels and hence lineage outcome lies at the heart of the controversy between a stochastic and an instructive mechanism in cell fate decision. In their simplest formulations, the stochastic model excludes the possibility of environmental regulation while the instructive/deterministic model favors the existence of an on/off switch conferred by a master gene or by the environment. Emerging evidence, however, suggests more plasticity in

lineage decision, and the possibility of combinatorial mechanisms comprising synergistic and antagonistic interactions among regulatory factors. Thus, one may envisage the possibility that the process is a finely tuned response to external stimuli.

The survival of hemopoietic progenitors is exquisitely dependent on extracellular growth factors. For example, the interaction between Steel factor and its receptor c-Kit is essential for the survival of CD34⁺ cells *in vitro* (Caceres-Cortes et al., 1994) and *in vivo* (Fleischman, 1993), which occurs in the absence of noticeable differentiation (Caceres-Cortes et al., 2001). Clonal assays for macrophage and granulocyte progenitors revealed the essential requirement in M- or GM-CSF for the generation of macrophages in culture (Metcalf, 1993). It was later shown that these cytokines are required to suppress apoptosis *in vitro* (Williams et al., 1990; Caceres-Cortes et al., 1994). Their function *in vivo* was revealed through the study of genetically-deficient mouse models. Bone marrow and alveolar macrophages in *M-CSF* deficient mice (op/op) appeared normal, while peritoneal and lymph node macrophages were severely reduced (Cecchini et al., 1994). Similarly, *GM-CSF*^{-/-} mice developed normally, except for an alveolar proteinosis, due to a dysfunction in alveolar macrophages (Seymour et al., 1997), decreased resistance to infection (Zhan et al., 1998) as well as defective T cell functions (Wada et al., 1997). Mice deficient in both *M-* and *GM-CSF* (op/op x *GM-CSF*^{-/-}) exhibit a more severe phenotype with bacterial pneumonic infections. Finally, mice lacking βc , the common receptor chain for GM-CSF, IL-3 and IL-5, showed reduced macrophage adhesion (Scott et al., 1998) and slower leukocyte recovery following bone marrow transplantation (Nishinakamura et al., 1995). Since GM-CSF and IL-3 are produced by activated T cells, the observations indicate that these two cytokines are part of the hematopoietic stress response, albeit redundant in macrophage

development and activation. Surprisingly, ectopic expression of GM-CSF receptors in CLPs was reported to convert these cells to the myelo-monocytic lineage (Iwasaki-Arai et al., 2003). Together, these observations provided further arguments into the debate over a permissive or an active role for growth factors in lineage selection.

The fact that GM-CSF upregulates PU.1 in CMP and GMP but not MEP raises the obvious question whether GM-CSF may favour lineage selection in multipotent cells. There is evidence that stem cells express low levels of lineage-specific genes and transcription factors (Hu et al., 1997; Billia et al., 2001; Orkin, 2000). In a context whereby multipotent cells are primed for multilineage differentiation, chance encounter of the appropriate combination of transcription factors with DNA may initiate the process of lineage commitment (Orkin, 2000). However, on interaction with the environment, e.g. through exposure to GM-CSF, PU.1 levels are upregulated *in vitro* (shown here) and *in vivo* (Shibata et al., 2001). Together these observations raise the possibility that GM-CSF either selects for the granulocyte macrophage lineage due to enhanced survival, or that GM-CSF drives lineage commitment through PU.1.

The pattern of gene expression in hematopoietic progenitors at the population level, i.e. in cells purified by surface phenotypes, conforms to the expected specificity of each transcription factor for the specified lineage. Thus, GMP express PU.1 but not SCL nor GATA-1, while MEP express SCL and GATA-1 but not PU.1 (Miyamoto et al., 2002; Akashi et al., 2000). However, when gene expression was examined at the single cell level, we observed more heterogeneity and more plasticity than anticipated (Brady et al., 1995; Hoang et al., 1996). Indeed, committed macrophage precursors, functionally identified through sib analysis, occasionally express low levels of SCL or even GATA-1. This promiscuous expression of erythroid transcription factors found at low levels in some CFU-GM may represent vestigial expression in cells that

are recently committed from the multipotent stage. Since PU.1 inhibits GATA-1 function (Rekhtman et al., 1999), we favour the hypothesis that the upregulation of PU.1 by GM-CSF consolidates the myeloid fate by several mechanisms, one that drives the myeloid differentiation/survival program and the other that prevents erythroid lineage infidelity due to random expression of SCL and/or GATA-1.

Together, our data are consistent with the view that the outcome of a stochastic process of differentiation initiated in multipotent progenitors can be regulated by extrinsic factors. These signals sustain the complex cellular and molecular interactions that are responsible for the rapid adaptive response to extrinsic perturbations. For example, antigenic challenge may trigger a transient increase in cytokine production by activated T cells. These cytokines include GM-CSF, causing a rapid adjustment of granulocyte macrophage production under conditions of antigenic challenge.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

All mice were housed in the pathogen free animal facility according to institutional animal care and use guidelines. C57BL/6J mice were purchased from Jackson laboratories (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA).

Growth factors

Except for recombinant hFLT3-L (Research Diagnostics Inc, Flanders, New Jersey, USA) and recombinant hG-CSF (Amgen Inc, Thousand Oaks, California, USA), all cytokines were produced as COS cell supernatants and were calibrated against recombinant standards.

Plasmids

PU.1 cDNA (gift from Dr D.G. Tenen, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) was subcloned into MSCV pgk neo, MSCV IRES EGFP or MSCV IRES EYFP (gift from Dr G. Sauvageau, IRIC, Montréal, Québec, Canada) in the sense or anti-sense orientation using the EcoRI restriction enzyme.

Western blotting

Nuclear extracts and Western blots were performed as previously described (Lecuyer et al., 2002), using anti-PU.1 rabbit polyclonal antibody (sc-352x, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), anti-PTP1D mouse monoclonal antibody (P54420, BD Transduction Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada), goat anti-mouse and goat anti-rabbit HRP conjugated polyclonal antibody (EMD Biosciences, Darmstadt, Germany and Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada, respectively).

Retroviral infection

Bone marrow cells were collected from mice injected with 150 mg/kg of 5-FU (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) 4 days earlier. Cells were plated in suspension culture in full support media (IMDM 15 % FBS, 10 ng/mL mIL-3, 10 ng/mL hIL-6, 100 ng/mL hIL-11, 100 ng/mL mSteel factor, 5×10^{-5} M α -monothioglycerol (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada)) at a final concentration of 10^6 cells per mL. After 48 hours of prestimulation, bone marrow cells were overlaid on irradiated (1500 cGy, cesium source) virus producing GP+E-86 cells in full support media supplemented with 0.8 μ g/mL of polybrene (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) for 48 hours. Cells were stimulated with the indicated growth factors, at these concentrations: 20 ng/mL mGM-CSF, 100 ng/mL hSF, 100 ng/mL hIL-11, 25 ng/mL mIL-3.

RNA preparation, cDNA synthesis and PCR amplification

Total RNA preparation, cDNA synthesis and PCR amplification have been described previously (Herblot et al., 2000). Oligonucleotide sequences are available upon request. Quantitative PCR was performed on MX3000 apparatus (Stratagene, La Jolla, California, USA) using the Brilliant® SYBR® Green QPCR Core Reagent Kit (Stratagene), according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry analysis and cell sorting

Following gene transfer, bone marrow cells were stained with CD11b (Mac-1)-APC (BD Pharmingen, Mississauga, Ontario, Canada) and Annexin-Alexa 350 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). 10^5 events were analyzed for each condition.

Fetal liver myeloid progenitors were purified as described (Traver et al., 2001). Briefly, mature lineage positive cells were depleted from fetal liver (e14.5) using magnetic beads and the remaining cells were stained with CD34-FITC (BD Pharmingen), Sca-PE (BD Pharmingen), c-kit-APC

(eBioscience), CD16/32(Fc γ R)-PE/Cy7 (eBioscience), biotinylated antibodies against CD3 (eBioscience), IL-7R α (BD Pharmingen), B220 (BD Pharmingen), Gr-1 (BD Pharmingen), CD11b (Mac-1) (BD Pharmingen) and Ter119 (eBioscience). Dead cells were excluded by propidium iodide staining (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

Analysis of apoptosis in GMP and MEP was done as follows. Cells (10^6) were stained with the following antibodies: CD34-PE (BD Pharmingen), c-kit-APC, CD16/32(Fc γ R)-PE/Cy7, biotinylated antibodies against CD3, IL-7R α , B220, Gr-1, CD11b (Mac-1) and Ter119. Apoptosis was analyzed using Annexin V-Cy5.5 staining (BD Pharmingen) and propidium iodide staining. Flow cytometry analysis was performed on the MoFlo flow cytometer (Cytomation, Fort Collins, Colorado, USA).

Liquid cell culture

Myeloid progenitors were cultured in non-treated Terazaki plates in IMDM 10% FBS. Cells were stimulated either with 20 ng/mL mGM-CSF or with 100 ng/mL mSteel Factor, 100 ng/mL hIL-11 and 100 ng/mL recombinant hFLT3-L (Research Diagnostics Inc, Flanders, New Jersey, USA). Cells were passaged every other day and kept at a concentration of 10^6 cells per mL.

Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as previously described (Lecuyer et al., 2002; Tremblay et al., 2003), using the 32D cell line kindly provided by Dr Quesenberry (Roger Williams Medical Center, Providence, RI). The 32D cell line was passaged every other day and kept at a concentration of $2,5 \times 10^4$ cells per mL in IMDM (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% FBS (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) and 10 ng/mL of mIL-3. $1,0 \times 10^5$ 32D cells per mL were stimulated with either 10 ng/mL mIL-3, 10 ng/mL recombinant hG-

CSF (Amgen Inc, Thousand Oaks, California, USA) or 10 ng/mL mGM-CSF for the indicated times. Cells treated with mGM-CSF were first stimulated with hG-CSF for 24 hours, to upregulate the GM-CSF receptor (Bigas et al., 1998). 5 μ g anti-PU.1 polyclonal rabbit antibody (sc-352x) and 5 μ g of a normal rabbit serum (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) were used for immunoprecipitation. Oligonucleotide sequences used for QPCR are available upon request.

Methylcellulose assays

Following the infection procedure, 2.5×10^3 bone marrow cells were plated in methylcellulose culture consisting of 1% methylcellulose (Fluka Chemie, Neu-Ulm, Switzerland), 10 % FBS, 200 μ g/mL transferrin (EMD Biosciences, Darmstadt, Germany), 2% bovine serum albumine (BSA, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 5×10^{-5} α -monothioglycerol (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and 1 U/mL erythropoietin in IMDM. These cultures were supplemented with the indicated growth factors, at these concentrations: 20 ng/mL mGM-CSF, 5 ng/mL mIL-3 and 100 ng/mL mSteel Factor. Colonies were scored 7 days later.

Patient data analysis

Data was obtained from (Golub et al., 1999). Mcl-1, A1, Bcl-2 and Bcl-x_L mRNA levels from AMLs and ALLs were plotted against those of PU.1 and the correlation coefficient was calculated on both populations, using the standard equation for a simple linear regression.

REFERENCES

- Akashi,K., Traver,D., Miyamoto,T., and Weissman,I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Anderson,K.L., Smith,K.A., Perkin,H., Hermanson,G., Anderson,C.G., Jolly,D.J., Maki,R.A., and Torbett,B.E. (1999). PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* 94, 2310-2318.
- Bigas,A., Martin,D.I., and Milner,L.A. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol. Cell Biol.* 18, 2324-2333.
- Billia,F., Barbara,M., McEwen,J., Trevisan,M., and Iscove,N.N. (2001). Resolution of pluripotential intermediates in murine hematopoietic differentiation by global complementary DNA amplification from single cells: confirmation of assignments by expression profiling of cytokine receptor transcripts. *Blood* 97, 2257-2268.
- Blobel,G.A. and Orkin,S.H. (1996). Estrogen-induced apoptosis by inhibition of the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol. Cell Biol.* 16, 1687-1694.
- Brady,G., Billia,F., Knox,J., Hoang,T., Kirsch,I.R., Voura,E.B., Hawley,R.G., Cumming,R., Buchwald,M., Siminovitch,K., Miyamoto,N., Boehmelt,G., and Iscove,N.N. (1995). Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* 5, 909-922.

Caceres-Cortes,J., Rajotte,D., Dumouchel,J., Haddad,P., and Hoang,T. (1994). Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 269, 12084-12091.

Caceres-Cortes,J.R., Krosi,G., Tessier,N., Hugo,P., and Hoang,T. (2001). Steel factor sustains SCL expression and the survival of purified CD34+ bone marrow cells in the absence of detectable cell differentiation. *Stem Cells* 19, 59-70.

Cecchini,M.G., Dominguez,M.G., Mocci,S., Wetterwald,A., Felix,R., Fleisch,H., Chisholm,O., Hofstetter,W., Pollard,J.W., and Stanley,E.R. (1994). Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* 120, 1357-1372.

Chao,J.R., Wang,J.M., Lee,S.F., Peng,H.W., Lin,Y.H., Chou,C.H., Li,J.C., Huang,H.M., Chou,C.K., Kuo,M.L., Yen,J.J., and Yang-Yen,H.F. (1998). *mcl-1* is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol. Cell Biol* 18, 4883-4898.

Dahl,R., Walsh,J.C., Lancki,D., Laslo,P., Iyer,S.R., Singh,H., and Simon,M.C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* 4, 1029-1036.

DeKoter,R.P. and Singh,H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.

DeKoter,R.P., Walsh,J.C., and Singh,H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J.* 17, 4456-4468.

Dranoff,G., Jaffee,E., Lazenby,A., Golumbek,P., Levitsky,H., Brose,K., Jackson,V., Hamada,H., Pardoll,D., and Mulligan,R.C. (1993). Faccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3539-3543.

Fairbairn,L.J., Cowling,G.J., Reipert,B.M., and Dexter,T.M. (1993). Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* 74, 823-832.

Fleischman,R.A. (1993). From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. *Trends in Genetics* 9, 285-290.

Garrett-Sinha,L.A., Su,G.H., Rao,S., Kabak,S., Hao,Z., Clark,M.R., and Simon,M.C. (1999). PU.1 and Spi-B are required for normal B cell receptor-mediated signal transduction. *Immunity* 10, 399-408.

Gasson,J.C. (1991). Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony- stimulating factor. [Review]. *Blood* 77, 1131-1145.

Golub,T.R., Slonim,D.K., Tamayo,P., Huard,C., Gaasenbeek,M., Mesirov,J.P., Coller,H., Loh,M.L., Downing,J.R., Caligiuri,M.A., Bloomfield,C.D., and Lander,E.S. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-537.

Herblot,S., Steff,A.M., Hugo,P., Aplan,P.D., and Hoang,T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat. Immunol.* *1*, 138-144.

Heufler,C., Koch,F., and Schuler,G. (1988). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* *167*, 700-705.

Hoang,T., Paradis,E., Brady,G., Billia,F., Nakahara,K., Iscove,N.N., and Kirsch,I.R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* *87*, 102-111.

Hohaus,S., Petrovick,M.S., Voso,M.T., Sun,Z., Zhang,D.E., and Tenen,D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* *15*, 5830-5845.

Hu,M., Krause,D., Greaves,M., Sharkis,S., Dexter,M., Heyworth,C., and Enver,T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* *11*, 774-785.

Irish,J.M., Hovland,R., Krutzik,P.O., Perez,O.D., Bruserud,O., Gjertsen,B.T., and Nolan,G.P. (2004). Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell* *118*, 217-228.

Iwasaki-Arai,J., Iwasaki,H., Miyamoto,T., Watanabe,S., and Akashi,K. (2003). Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. *J Exp. Med.* *197*, 1311-1322.

Just,U., Stocking,C., Spooncer,E., Dexter,T.M., and Ostertag,W. (1991). Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in

hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* 64, 1163-1173.

Kappel,A., Schlaeger,T.M., Flamme,I., Orkin,S.H., Risau,W., and Breier,G. (2000). Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* 96, 3078-3085.

King,A.G., Kondo,M., Scherer,D.C., and Weissman,I.L. (2002). Lineage infidelity in myeloid cells with TCR gene rearrangement: a latent developmental potential of proT cells revealed by ectopic cytokine receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4508-4513.

Kulesa,H., Frampton,J., and Graf,T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev.* 9, 1250-1262.

Lecuyer,E., Herblot,S., Saint-Denis,M., Martin,R., Begley,C.G., Porcher,C., Orkin,S.H., and Hoang,T. (2002). The SCL-complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100, 2430-2440.

Liao,E.C., Trede,N.S., Ransom,D., Zapata,A., Kieran,M., and Zon,L.I. (2002). Non-cell autonomous requirement for the bloodless gene in primitive hematopoiesis of zebrafish. *Development* 129, 649-659.

Linette,G.P. and Korsmeyer,S.J. (1994). Differentiation and cell death: lessons from the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 6, 809-815.

Martin, R., Lahlil, R., Damert, A., Miquerol, L., Nagy, A., Keller, G., and Hoang, T. SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* 131, 693-702. 3-3-2004.

Ref Type: Generic

McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., and Maki, R.A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 15, 5647-5658.

Metcalf, D. (1993). Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?. [Review]. *Blood* 82, 3515-3523.

Miyamoto, T., Iwasaki, H., Reizis, B., Ye, M., Graf, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2002). Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev. Cell* 3, 137-147.

Moreau-Gachelin, F., Wendling, F., Molina, T., Denis, N., Titeux, M., Grimmer, G., Briand, P., Vainchenker, W., and Tavittian, A. (1996). Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol. Cell Biol.* 16, 2453-2463.

Nakajima, H. and Ihle, J.N. (2001). Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood* 98, 897-905.

Nerlov, C. and Graf, T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12, 2403-2412.

Nishinakamura, R., Nakayama, N., Hirabayashi, Y., Inoue, T., Aud, D., McNeil, T., Azuma, S., Yoshida, S., Toyoda, Y., and Arai, K. (1995). Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity.* 2, 211-222.

Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1, 57-64.

Pardoll,D.M. (1995). Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 399-415.

Rajotte,D., Haddad,P., Haman,A., Cragoe,E.J., Jr., and Hoang,T. (1992). Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *J Biol Chem* 267, 9980-9987.

Rekhtman,N., Radparvar,F., Evans,T., and Skoultchi,A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* 13, 1398-1411.

Rodriguez-Cimadevilla,J.C., Beauchemin,V., Villeneuve,L., Letendre,F., Shaw,A., and Hoang,T. (1990). Coordinate secretion of interleukin-1 beta and granulocyte- macrophage colony-stimulating factor by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: role of interleukin-1 as an endogenous inducer. *Blood* 76, 1481-1489.

Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118.

Scott,C.L., Hughes,D.A., Cary,D., Nicola,N.A., Begley,C.G., and Robb,L. (1998). Functional analysis of mature hematopoietic cells from mice lacking the betac chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood* 92, 4119-4127.

Scott,E.W., Fisher,R.C., Olson,M.C., Kehrli,E.W., Simon,M.C., and Singh,H. (1997). PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity.* 6, 437-447.

Scott,E.W., Simon,M.C., Anastasi,J., and Singh,H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.

Seymour,J.F., Lieschke,G.J., Grail,D., Quilici,C., Hodgson,G., and Dunn,A.R. (1997). Mice lacking both granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF have impaired reproductive capacity, perturbed neonatal granulopoiesis, lung disease, amyloidosis, and reduced long-term survival. *Blood* 90, 3037-3049.

Shibata,Y., Berclaz,P.Y., Chroneos,Z.C., Yoshida,M., Whitsett,J.A., and Trapnell,B.C. (2001). GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 15, 557-567.

Smith,A., Metcalf,D., and Nicola,N.A. (1997). Cytoplasmic domains of the common beta-chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. *EMBO J* 16, 451-464.

Socolovsky,M., Fallon,A.E., Wang,S., Brugnara,C., and Lodish,H.F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a/-5b/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181-191.

Tenen,D.G., Hromas,R., Licht,J.D., and Zhang,D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. [Review] [455 refs]. *Blood* 90, 489-519.

Traver,D., Miyamoto,T., Christensen,J., Iwasaki-Arai,J., Akashi,K., and Weissman,I.L. (2001). Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood* 98, 627-635.

Tremblay,M., Herblot,S., Lecuyer,E., and Hoang,T. (2003). Regulation of pTalpha gene expression by a dosage of E2A, HEB and SCL. *J. Biol. Chem.* ..

Trevisan,M., Yan,X.Q., and Iscove,N.N. (1996). Cycle initiation and colony formation in culture by murine marrow cells with long-term reconstituting potential in vivo. *Blood* 88, 4149-4158.

Wada,H., Noguchi,Y., Marino,M.W., Dunn,A.R., and Old,L.J. (1997). T cell functions in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12557-12561.

Weiss,M.J. and Orkin,S.H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9623-9627.

Williams,G.T., Smith,C.A., Spooncer,E., Dexter,T.M., and Taylor,D.R. (1990). Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343, 76-79.

Zhan,Y., Lieschke,G.J., Grail,D., Dunn,A.R., and Cheers,C. (1998). Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood* 91, 863-869.

Zhang,D.E., Zhang,P., Wang,N.D., Hetherington,C.J., Darlington,G.J., and Tenen,D.G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 569-574.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. GM-CSF Up-Regulates PU.1, A1 and Mcl-1 Expression in Myeloid Progenitor Cells.

- (A) Isolation of myeloid progenitors in mouse fetal liver. The Lin⁻ Sca⁻ c-kit⁺ fraction was subdivided into FcγR^{lo}CD34⁺ (CMP), FcγR^{hi}CD34⁺ (GMP) and FcγR^{lo}CD34⁻ (MEP) populations. The percentages of each population relative to the starting population of fetal liver cells are shown next to the FACS diagram. Each population was assayed for purity in methylcellulose and the percentage of each colony type generated (CFU-GM, -E/MEG and -GEMM) is shown in the histogram.
- (B) Semi-quantitative RT-PCR performed on each population immediately after sorting. Gene-specific oligonucleotide primers were used for PU.1, GMRβ, A1, Mcl-1, GATA-1, EpoR, Bcl-x_L and S16. All mRNA levels were normalized to those of S16. Results shown are representative of three separate experiments.
- (C) Myeloid progenitor growth in the presence of GM-CSF or other cytokines. Fetal liver cells were stained and sorted as described. GMP, CMP and MEP were cultured with either GM-CSF (black circles) or FLT3-L/SF/IL-11 (white squares). Viable cell counts were performed through trypan blue exclusion. Results shown are representative of two separate experiments.
- (D) Quantification of PU.1, Bcl-x_L, Mcl-1 and A1 mRNA levels in each population. At the indicated times, cells were harvested for RNA extraction and RT-PCR was performed. PU.1, Bcl-x_L, Mcl-1 and A1 mRNA levels were estimated using Multigauge software and were normalized to those of S16 (same legend as in panel C). A1 induction in GMP by GM-CSF is shown above the graph. Results shown are representative of two separate experiments.

Figure 2. PU.1 occupies the *Mcl-1* and *A1* Promoters *in vivo*.

- (A) PU.1 expression in cytokine-stimulated 32D cells. The cells were grown in IL-3 containing medium, or stimulated with G-CSF (24 hours) or G-CSF (24 hours) and GM-CSF (96 hours) as described in Materials and Methods. RT-PCR was performed; mRNA levels were estimated by Q-PCR and normalized to those of HPRT (left panel). PU.1 protein level was also assayed by Western blotting and PTP-1D was used as a loading control (right panel).
- (B) 32D cells differentiate into macrophages in the presence of GM-CSF. The same time points as panel A were used. Cytospins were performed and cells were fixed and revealed using the Wright Stain. Flow cytometry was also performed at each time point to assay the number of CD11b-positive cells.
- (C) Gene expression in cytokine-stimulated 32D cells. The same time points as panel A were used. RT-PCR was performed; CD11b, GMR α , *Mcl-1* and *A1* mRNA levels were estimated by Q-PCR and normalized to those of HPRT (as in B).
- (D) Chromatin immunoprecipitation of PU.1 bound to *Mcl-1*, *A1* and *c-Kit* promoters in stimulated 32D cells (see legend in B). Fragmented chromatin extracts were subjected to immunoprecipitation with an anti-PU.1 antibody or a control rabbit IgG. Q-PCR analysis was performed to test for the presence of the *Mcl-1*, *A1* and *c-Kit* promoters. When compared to input chromatin (10% of the amount used in each immunoprecipitation), the percentage of the *A1* promoter sequences in the anti-PU.1 immunoprecipitate in 32D cells stimulated with IL-3, G-CSF or GM-CSF were 0.4%, 3.8% and 8.1%, respectively; the percentage of the *Mcl-1* promoter sequences were 0.2%, 1.2% and 4.5%, respectively.

Figure 3. Anti-sense PU.1 Decreases PU.1 Protein Levels and Causes Apoptosis in CD11b-positive cells.

- (A) Lower PU.1 levels are associated with apoptosis in the CD11b⁺ population exposed to GM-CSF. FACS analysis of 5-FU bone marrow cells infected with an empty vector or with anti-sense PU.1, under neomycin selection. The cells were cultured in the presence of SF or GM-CSF for 2 days, followed by CD11b staining and Annexin V staining to assess viability.
- (B) Decreased CD11b expression and increased apoptosis in bone marrow cells expressing anti-sense PU.1. 5-FU bone marrow cells (AS-PU.1-EGFP) were infected with an empty vector (MSCV-EGFP) or with anti-sense PU.1 and maintained with GM-CSF. Infected cells were selected by GFP expression. Two days later, cells were stained with a CD11b antibody and Annexin V. The infection efficiency revealed by GFP fluorescence was 86 % for MSCV and 61% for AS-PU.1. The reported results are representative of the results obtained in three different experiments.
- (C) Anti-sense PU.1 reduces PU.1 protein levels. 5-FU bone marrow cells from C57BL/6J mice were infected with an empty vector (MSCV), with PU.1 in the sense or anti-sense orientation. The intensities of the PU.1 signals were normalized to those of PTP-1D and the ratio obtained with control cells expressing the empty MSCV vector was taken as 1.
- (D) Semi-quantitative RT-PCR of A1, CD11b, GMRb, Mcl-1 and S16 of cells shown in panel B. The results are representative of two different experiments.

Figure 4. PU.1^{-/-} fetal liver cells show decreased expression of PU.1 target genes.

- (A) Gene expression in fetal liver cells. WT and PU.1^{-/-} fetal liver cells were harvested at e13.5 and were cultured or not in a mixture of IL-3, IL-6 and SF for 4 days. RNA extraction followed and RT-PCR was performed. A1, Bcl-x_L, CD11b, GMR α , GMR β and Mcl-1 mRNA levels were estimated by Q-PCR and normalized to those of HPRT.
- (B) RT-PCR of GMR α , Mcl-1 and β -actin performed on the same populations as panel A.

Figure 5. Apoptosis and cell growth in purified GMP and MEP.

- (A) Apoptosis of GMP in response to GM-CSF. 5-FU bone marrow cells were infected with an empty vector (MSCV YFP) or with anti-sense PU.1 (YFP), and were cultured with GM-CSF. After infection, Annexin V staining was determined daily for 3 days by multicolor flow cytometry analysis (data shown for day 3 post infection). Shown are Lin⁻ cells gated for c-Kit, Fc γ R^{hi} and YFP expression. All CD34⁺ cells in the histograms represent GMPs.
- (B) Kinetics of apoptosis in GMP and MEP in response to GM-CSF. 5-FU bone marrow cells (MSCV control: white bars; AS-PU.1: black bars) were analyzed as above and the percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry of GMP and MEP as gated in Figure 1A. The infection efficiency for MSCV-YFP-expressing cells was 65.3 % (GMP) and 70.8 % (MEP); AS-PU.1-YFP-expressing cells were infected at 60.6 % (GMP) and 84.9 % (MEP).

Figure 6. Effect of decreased PU.1 levels on colony forming cells.

- (A) 5-FU bone marrow cells were infected with an empty vector (MSCV) or with anti-sense PU.1. Cells were pre-stimulated in

suspension for 24 hours with GM-CSF or IL-3/SF. The cells were then plated in methylcellulose containing either GM-CSF or IL-3/SF. Granulocyte and macrophage colonies (CFU-GM) were scored on day 7. CFU-GM frequency of 5-FU bone marrow cells infected with an empty vector (white bars) or with anti-sense PU.1 (black bars) in response to GM-CSF or IL-3/SF. Similar results were obtained with MSCV-neo (as shown) or with MSCV-GFP (not shown).

(B) Proposed pathway for the survival of myeloid cells in response to GM-CSF.

Figure 7. Direct correlation between PU.1, A1 and Mcl-1 levels in AML.

Data was obtained from (Golub et al., 1999). Mcl-1, A1, Bcl-2 and Bcl-x_L mRNA levels from AMLs (black circles) and ALLs (open circles) were plotted against those of PU.1. The correlation coefficient is shown next to each plot.

FIGURES

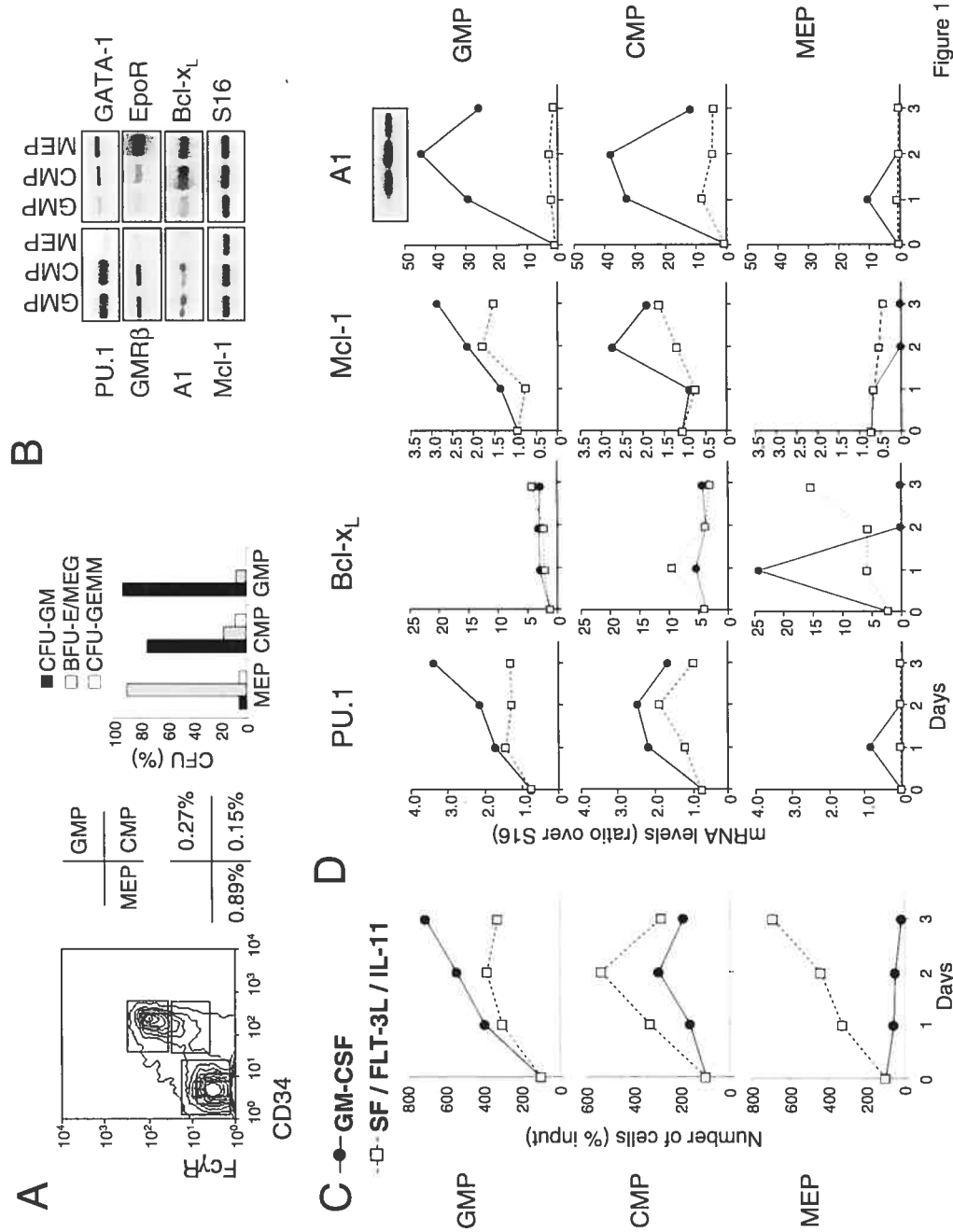


Figure 1

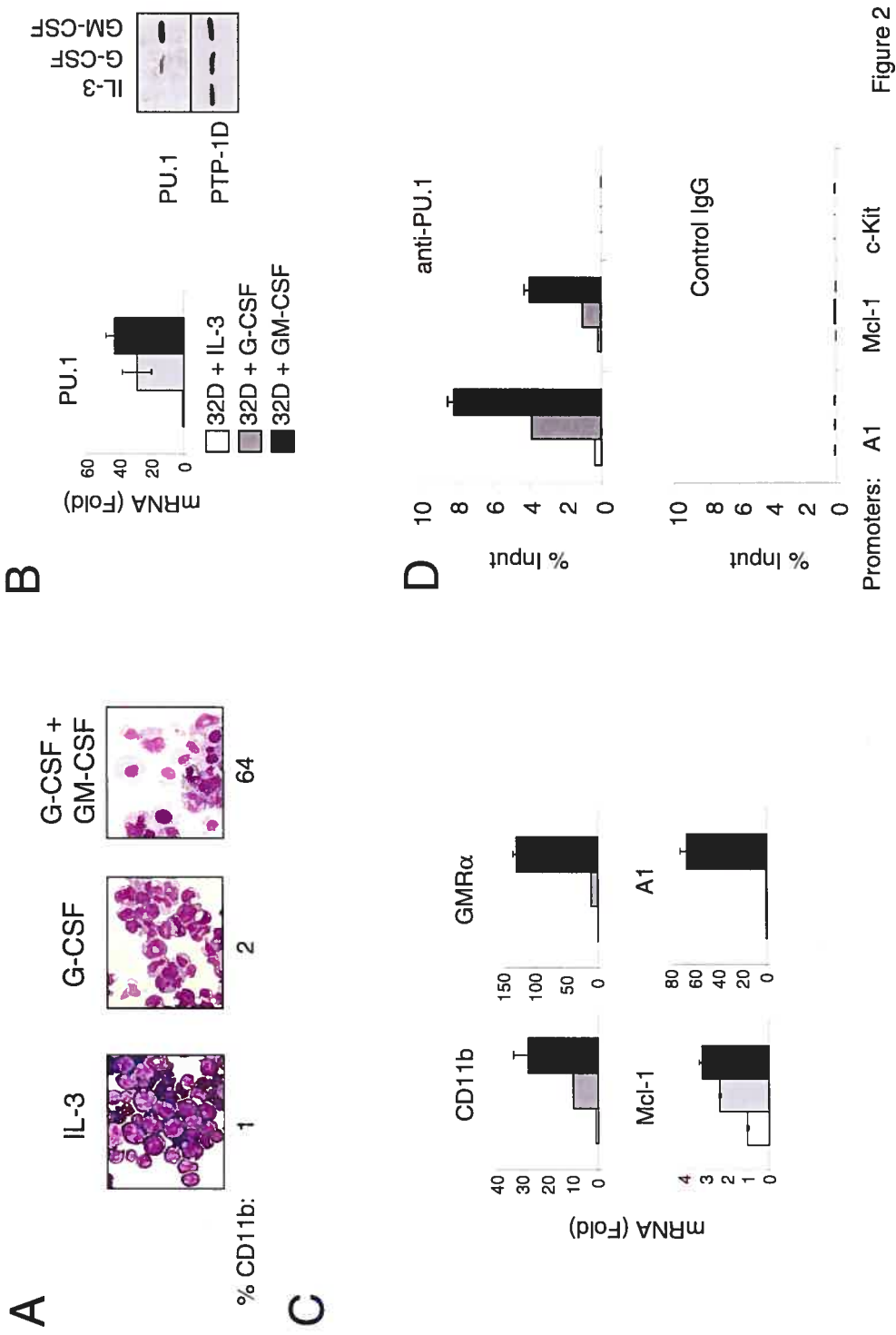


Figure 2

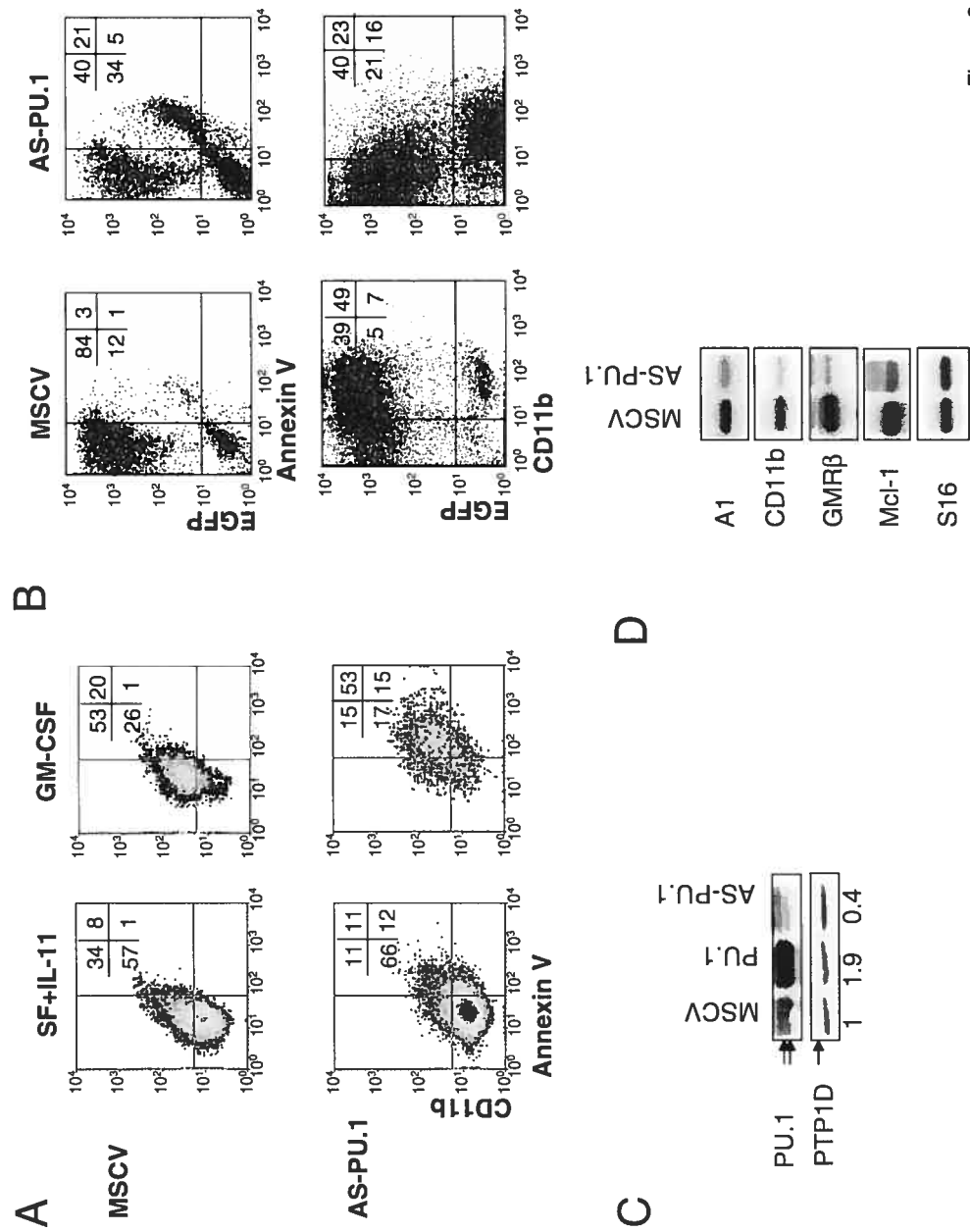


Figure 3

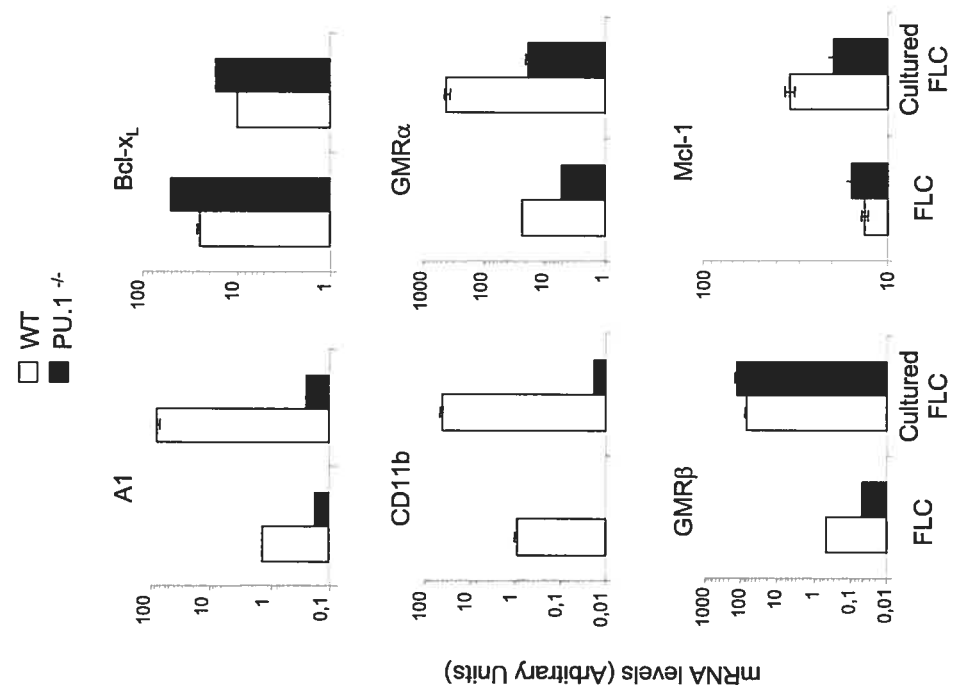


Figure 4

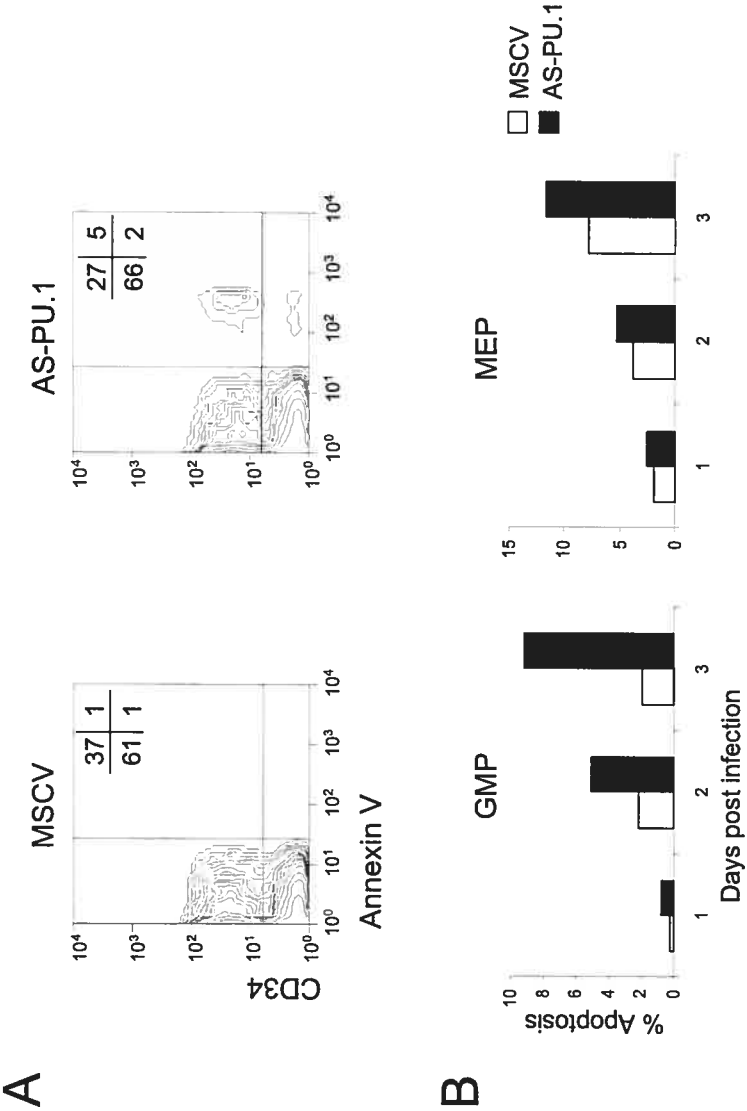


Figure 5

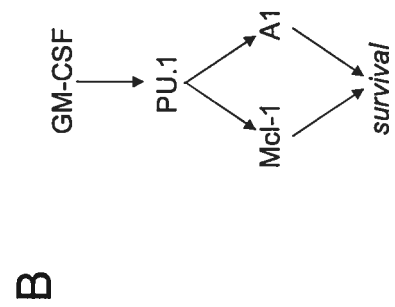
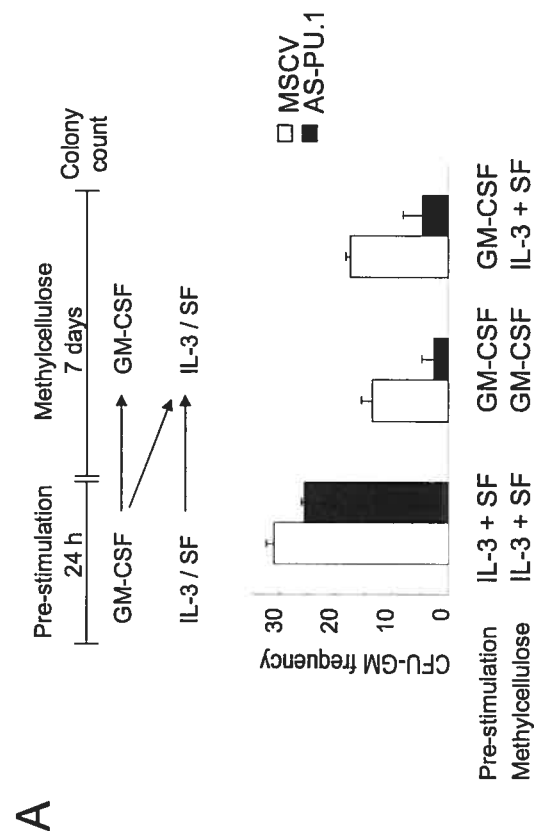


Figure 6

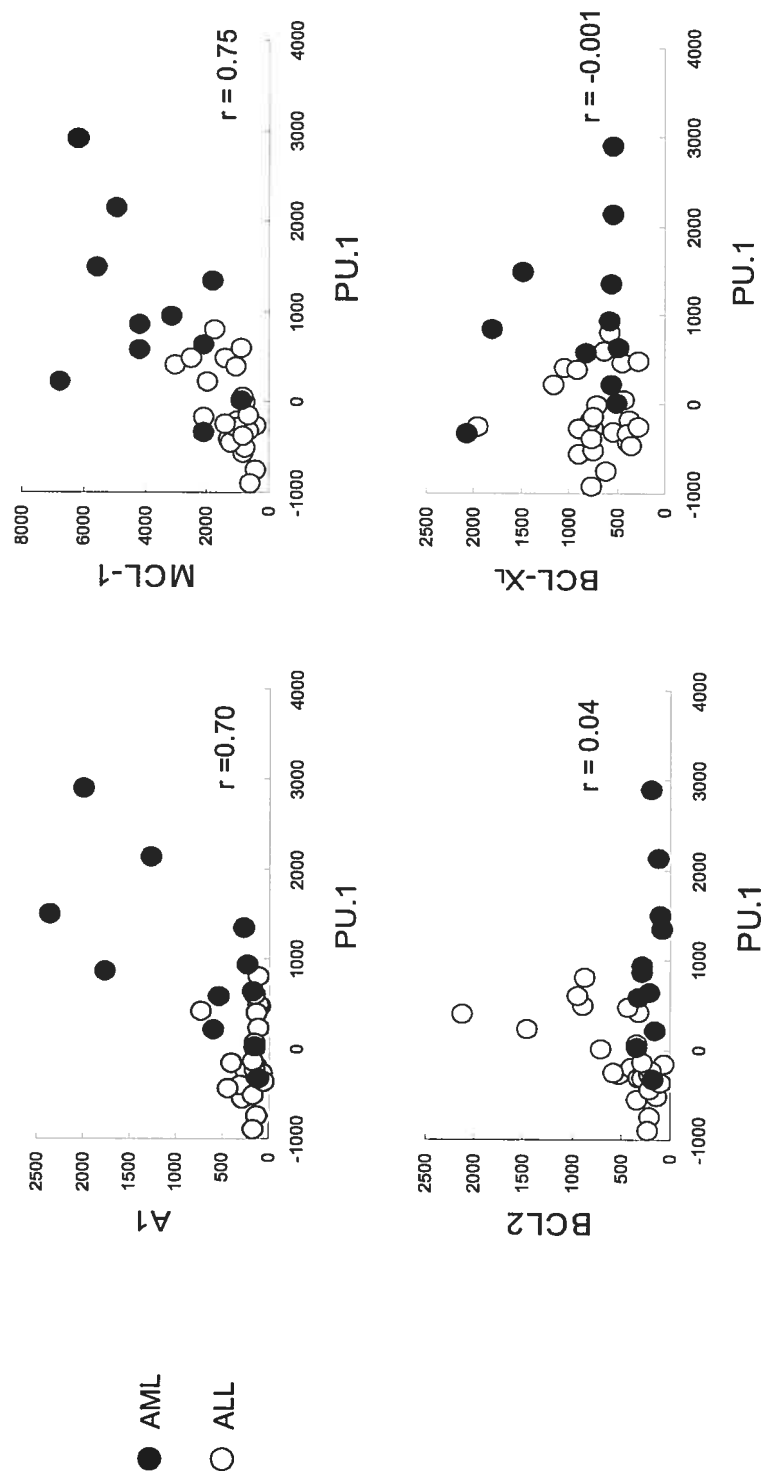


Figure 7

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Analyse clonale de la fonction de PU.1 et de la différenciation érythroïde

Un gradient d'expression de PU.1 détermine un destin différent : une plus grande expression de PU.1 favorise la lignée myéloïde alors qu'une expression plus faible conduit à la lignée lymphoïde B (DeKoter and Singh, 2000). De plus, l'expression ectopique de PU.1 dans la lignée érythroïde empêche le développement des précurseurs érythroïdes en cellules matures. Nous avons donc voulu vérifier si PU.1 pouvait influencer le destin cellulaire chez des précurseurs multipotents. Pour ce faire, nous avons analysé le contenu en gènes érythroïdes et myéloïdes de colonies hématopoïétiques multipotentes, c'est-à-dire de colonies qui ont la possibilité de former plusieurs types de cellules (macrophages, granulocytes, érythrocytes et mégacaryocytes). Nous avons choisi les gènes érythroïdes GPA et β globine pour représenter le contenu érythroïde de la cellule, alors que le contenu myéloïde a été évalué par l'expression de deux gènes cibles de PU.1, CD11b et le lysozyme. Des colonies multipotentes individuelles ont été choisies au hasard dans une culture de cellules de moelle osseuse normale. L'expression génique a ensuite été déterminée par RT-PCR à partir d'un nombre fixe de cellules. Les figures 8A et 8B montrent qu'il y a une corrélation directe entre le niveau d'expression de CD11b, du lysozyme et de PU.1. Par contre, le niveau d'expression de GPA et de β globine est inversement proportionnel à celui de PU.1. De plus, lorsque le niveau d'expression de PU.1 est réduit par la stratégie d'anti-sens PU.1, le niveau d'expression de CD11b est diminué alors que celui de la β globine est augmenté, comparativement aux colonies exprimant un vecteur vide (Figure 8C et 8D). Cette augmentation de β globine se produit sans changement d'expression de GATA-1. Comme PU.1 est

un antagoniste de la fonction de GATA-1 (Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1999), cette analyse clonale suggère que l'augmentation d'expression de PU.1 favorise le développement de la lignée myéloïde au détriment de la lignée érythroïde. Tous les résultats montrés jusqu'à présent suggèrent que le GM-CSF peut consolider le développement myéloïde via PU.1 de deux façons : la première en permettant la survie des précurseurs myéloïdes via l'activation des gènes anti-apoptotiques A1 et Mcl-1 et la seconde en favorisant le programme de différenciation myéloïde au détriment du programme érythroïde.

RÉFÉRENCES

DeKoter,R.P. and Singh,H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.

Rekhtman,N., Radparvar,F., Evans,T., and Skoultchi,A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* 13, 1398-1411.

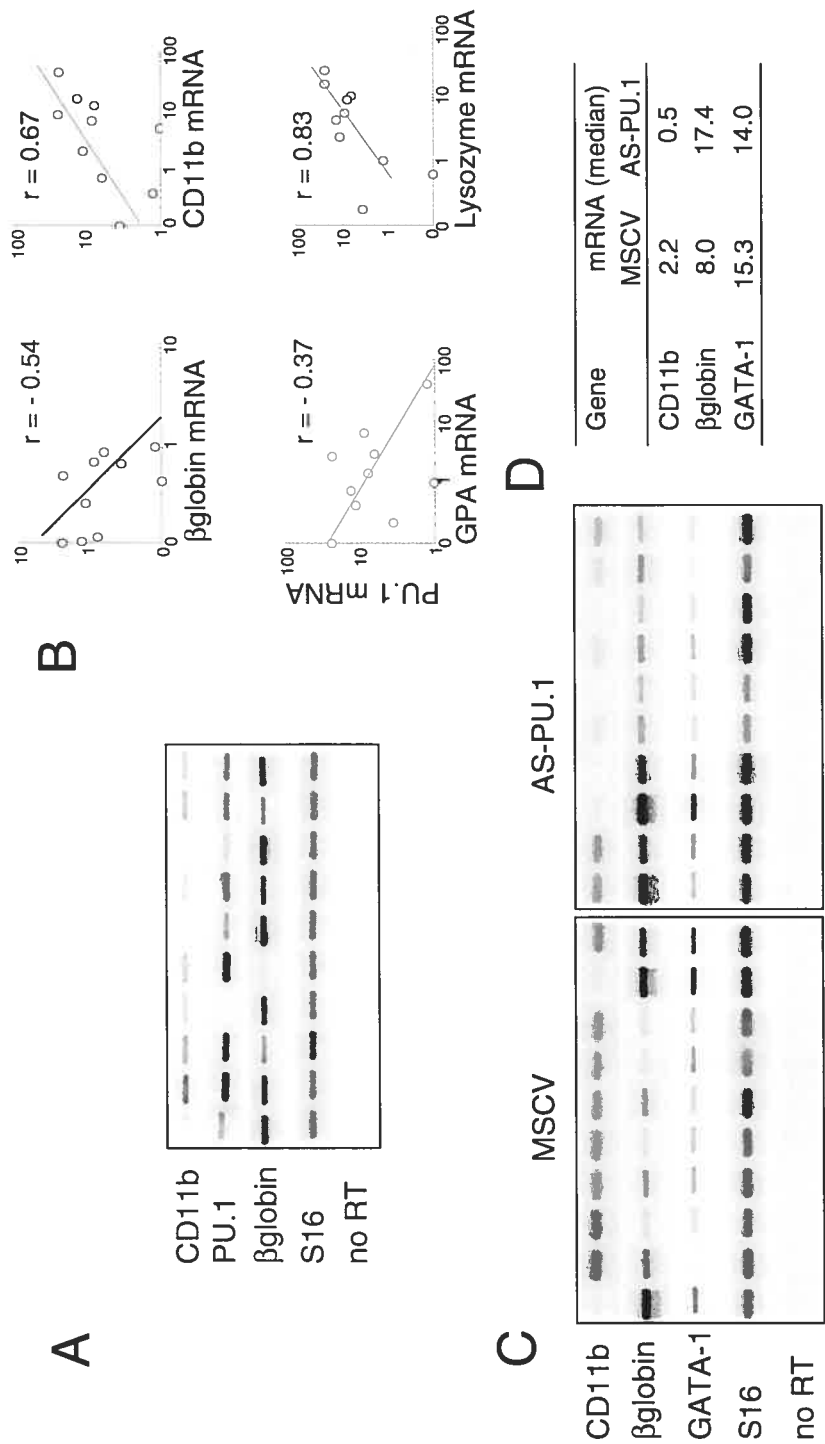
Zhang,P., Behre,G., Pan,J., Iwama,A., Wara-aswapati,N., Radomska,H.S., Auron,P.E., Tenen,D.G., and Sun,Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 8705-8710.

LÉGENDE DE LA FIGURE

Figure 8. Analyse clonale de la fonction de PU.1 et de la différenciation érythroïde.

- (A) Corrélation inverse entre le niveau d'expression de la β globine et de PU.1 dans des colonies multipotentes individuelles. Les colonies multipotentes ont été cultivées avec du SF/IL-3, tel que décrit dans la figure 6A, et choisies au hasard. Un nombre égal de cellules ont été récoltées afin d'effectuer un RT-PCR semi-quantitatif. L'amplification a été réalisée grâce à des oligonucléotides spécifiques pour PU.1, CD11b, β globine, GATA-1 et S16.
- (B) Corrélation directe entre les niveaux d'expression de PU.1 et de gènes myéloïdes (lysozyme, CD11b) et corrélation inverse entre les niveaux d'expression de PU.1 et de gènes érythroïdes (β globine, GPA). Les coefficients de corrélation (r) sont montrés à côté de chaque graphique.
- (C) Analyse par RT-PCR semi-quantitatif de colonies multipotentes exprimant les vecteurs d'expression MSCV (vecteur vide) ou AS-PU.1. Les niveaux d'ARNm ont été estimés par le logiciel MultiGauge.
- (D) Quantification du panneau (C). La médiane a été calculée pour chaque gène et condition d'infection.

FIGURE 8



CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION

1. DISCUSSION

L'hématopoïèse est un processus complexe qui répond aux besoins de l'organisme et qui est modulée par deux types de facteurs : les facteurs extrinsèques et les facteurs intrinsèques. Cependant, le rôle exact de chaque type de facteur est encore méconnu et il reste beaucoup de choses à découvrir sur la collaboration entre les facteurs de chaque type.

Dans la lignée myéloïde, le GM-CSF, une cytokine, joue un rôle important dans la prolifération, la survie, la différenciation terminale et la fonctionnalité des cellules myéloïdes. PU.1, quant à lui, est un facteur de transcription qui permet le développement de la lignée myéloïde. Son rôle important a été élucidé en partie par son inactivation chez la souris et il est reconnu pour être un régulateur-clé du développement myéloïde. Les nombreux gènes-cibles de PU.1 qui sont connus jusqu'à maintenant affectent la différenciation terminale et la fonctionnalité des cellules myéloïdes.

Les travaux ici présentés suggèrent que le GM-CSF peut jouer ses rôles de différenciation et de survie grâce à l'action de PU.1. En effet, une diminution de l'expression de PU.1 bloque les fonctions de différenciation et de survie engendrés par le GM-CSF, suggérant ainsi que PU.1 agit en aval du GM-CSF. Ainsi, une diminution de l'expression de PU.1 provoque la mort cellulaire par apoptose en réponse au GM-CSF (Figures 3A, 3B et 5) ainsi qu'une diminution de l'expression de deux gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, soient A1 et Mcl-1 (Figures 3D et 4). Ces deux gènes sont des gènes-cibles de PU.1 et l'occupation de leur promoteur par PU.1 augmente en réponse au GM-CSF (Figure 2). De plus, une diminution de l'expression de PU.1 engendre un blocage de la différenciation myéloïde de même qu'une

diminution de l'expression de gènes de différenciation myéloïdes tels que CD11b et GMR $\alpha\beta$. L'analyse de cas cliniques de leucémies myéloïdes aigues chez l'humain (Figure 7) montre une corrélation positive entre l'expression de PU.1, de A1 et de Mcl-1, suggérant qu'une augmentation de l'expression de PU.1 chez des cellules cancéreuses pourrait leur donner un avantage de survie, par l'intermédiaire de A1 et de Mcl-1. Les travaux présentés suggèrent enfin que PU.1 consolide la voie de différenciation myéloïde en réponse au GM-CSF (Figure 8). En effet, il existe une corrélation inverse entre l'expression de gènes myéloïdes (PU.1, CD11b, lysozyme) et érythroïdes (GPA, β globine) au sein de colonies multipotentes. Enfin, lorsqu'il y a une diminution de l'expression de PU.1, l'expression des gènes myéloïdes est diminuée alors que certains gènes de différenciation érythroïde sont augmentés.

Tous ces résultats, mis ensemble, suggèrent que PU.1 pourrait jouer son rôle de régulateur-clé de la myélopoïèse de deux façons. En réponse à une cytokine spécifique, le GM-CSF, PU.1 amorcerait d'abord le programme de différenciation myéloïde en augmentant l'expression des gènes myéloïdes de survie (A1 et Mcl-1) et de différenciation (CD11b, et GMR $\alpha\beta$). Ensuite, PU.1 préviendrait la différenciation érythroïde, en bloquant l'expression des gènes érythroïdes (GPA, β globine) grâce à son antagonisme avec GATA-1. Ces différents points seront discutés plus en détail dans le chapitre qui suit.

1.1 Une voie génétique impliquant le récepteur du GM-CSF, PU.1 et Mcl-1 / A1

Nous avons montré, dans cette étude, que les niveaux d'expression de PU.1, de Mcl-1 et de A1 augmentaient lors d'une stimulation au GM-CSF. De plus, lorsque le niveau d'expression de PU.1 est réduit par une

stratégie d'anti-sens ou d'inactivation génique, les niveaux de Mcl-1 et de A1 sont également diminués et les cellules meurent par apoptose, même lorsqu'elles sont stimulées au GM-CSF. Ces résultats suggèrent qu'il existe une voie génétique entre le récepteur du GM-CSF, PU.1 et les gènes de survie Mcl-1 et A1.

Il a été montré par d'autres groupes que les chaînes α et β du récepteur du GM-CSF sont des gènes-cibles de PU.1 (Hohaus et al., 1995; DeKoter et al., 1998). Ceci suggère que PU.1 régule la survie et la différenciation des cellules myéloïdes par le récepteur à cytokine du GM-CSF. Cependant, nous montrons que ces deux gènes sont tout de même exprimés à de faibles niveaux lorsque le niveau d'expression de PU.1 est diminué par une stratégie d'anti-sens ou d'inactivation génique. De plus, un groupe a montré que l'expression ectopique du récepteur du GM-CSF dans des cellules dépourvues de PU.1 ne permettait pas de restaurer le développement des cellules myéloïdes (Anderson et al., 1999). Ces derniers résultats suggèrent donc que PU.1 serait aussi un médiateur essentiel de la voie de signalisation du GM-CSF.

Le fait qu'un facteur de transcription joue ce double rôle, c'est-à-dire de régulateur et de médiateur d'une voie de signalisation donnée, n'est pas singulier. Ce mécanisme est retrouvé à différents niveaux lors de l'hématopoïèse, notamment dans l'érythropoïèse et la granulopoïèse. Par exemple, le gène Flk-1 code pour un récepteur tyrosine kinase qui est important pour l'érythropoïèse primitive. Celui-ci est un gène-cible de SCL (Kappel et al., 2000), un facteur de transcription clé impliqué dans l'érythropoïèse et l'établissement de l'hématopoïèse. Il a été montré qu'une diminution de la signalisation par Flk-1 provoque une diminution de l'expression de SCL. De plus, l'expression ectopique de SCL permet de restaurer l'apoptose observée par une diminution de

VEGF, un ligand du récepteur Flk-1 (Martin et al., 2004). Ceci suggère que Flk-1 et SCL sont dans la même voie génétique, tout comme le récepteur du GM-CSF et PU.1. De plus, SCL agit autant comme régulateur de la voie de Flk-1 que comme médiateur, tout comme le GM-CSF et PU.1. Un autre exemple du même mécanisme se retrouve dans la granulopoïèse. Le récepteur du G-CSF est un gène-cible du facteur de transcription C/EBP α (Zhang et al., 1997) et une stimulation au G-CSF provoque la différenciation des cellules en granulocytes en augmentant les niveaux protéiques de C/EBP α (Dahl et al., 2003).

Tous les cas présentés ci-haut ont un second point en commun : les facteurs de transcription mentionnés sont tous des pivots dans leur lignée propre, c'est-à-dire qu'ils jouent des rôles extrêmement importants dans le développement d'une lignée particulière. Tous ces résultats, mis ensemble, nous portent à croire qu'au sein du tissu hématopoïétique, il existe une boucle de rétroaction positive entre des facteurs de transcription clés et des récepteurs aux facteurs de croissance, ce qui permet de moduler le destin cellulaire via la survie et la différenciation d'une lignée donnée.

Les cellules hématopoïétiques nécessitent l'apport constant de signaux de survie qui sont transmis à travers les récepteurs aux facteurs de croissance. En effet, par défaut, les cellules hématopoïétiques meurent par apoptose. Il n'est donc pas surprenant que les facteurs de transcription clés, qui permettent le développement d'une lignée donnée, régulent l'expression de ces récepteurs. Comme nos résultats le suggèrent, les facteurs de transcription peuvent aussi jouer un autre rôle dans la survie des cellules hématopoïétiques et ce, en aval des récepteurs aux cytokines. Nos résultats montrent que l'expression de deux protéines anti-apoptotiques, Mcl-1 et A1, est régulée par PU.1 en réponse au GM-CSF. Enfin, de nouveaux résultats obtenus au laboratoire suggèrent que la voie de signalisation de l'érythropoïétine

(Epo) converge vers SCL, un facteur de transcription clé, et que ce dernier pourrait activer la transcription de API5, un gène anti-apoptotique (Lahlil et al., en préparation).

De plus, ceci suggère qu'au niveau moléculaire, un seul facteur de transcription (PU.1) contrôle aussi bien la différenciation, par des gènes tissu-spécifique (CD11b, lysozyme), que la survie, par des gènes anti-apoptotiques (Mcl-1, A1). Il existe d'autres exemples de ce mécanisme au sein du tissu hématopoïétique. Par exemple, GATA-1 est un facteur de transcription clé pour le développement de la lignée érythroïde définitive. L'inactivation génique de GATA-1 bloque la différenciation érythrocytaire *in vivo* et les cellules meurent par apoptose lorsqu'elles sont stimulées à se différencier en érythrocytes (Weiss and Orkin, 1995). GATA-1 contrôle donc la différenciation de même que la survie dans la lignée érythroïde. Un autre exemple existe au sein de cette même lignée : dans la voie de signalisation de l'érythropoïétine, SCL est capable d'activer la transcription d'API5 pour promouvoir la survie, de même que celle de la glycophorine A, un gène de différenciation érythroïde (Lahlil et al, en préparation). Il a été discuté brièvement dans l'introduction de ce mémoire que les fonctions de différenciation et de survie étaient intimement liées : sans survie, aucune différenciation n'est possible. Le lien entre ces deux fonctions pourrait donc être les facteurs de transcription clés, qui activent la transcription de plusieurs gènes-cibles aux fonctions différentes.

Le mécanisme que nous proposons implique donc que des signaux différents, engendrés par des cytokines ou des facteurs de croissance, convergent vers une seule protéine qui, à son tour, génère plusieurs effets déterminants pour la survie et la différenciation. Cette protéine centrale engendre des effets nouveaux (production de nouvelles protéines) mais permet aussi une rétroaction positive sur le système, de

manière à amplifier un signal. Ce même mécanisme est aussi probablement vrai pour d'autres fonctions cellulaires générales comme la prolifération ou encore pour d'autres fonctions plus spécifiques, comme la phagocytose ou la production d'anticorps.

Ce processus, où un seul gène (activé par des facteurs de croissance) est responsable de plusieurs fonctions importantes dans une cellule, semble être répandu dans tout le système hématopoïétique, notamment, comme nous l'avons vu, dans les lignées myéloïdes et érythroïdes.

1.2 Destin cellulaire, cytokines et facteurs de transcription

Le facteur de transcription PU.1 permet le développement de la lignée myéloïde, comme nous l'avons vu. Il est également important dans le développement des granulocytes et des lymphocytes B. Comment un seul facteur peut-il jouer tous ces rôles au sein du tissu hématopoïétique? Il s'agit en fait de dosage. En effet, un niveau plus élevé de PU.1 chez les précurseurs dirige la différenciation vers la lignée myéloïde (granulocytes et macrophages), alors qu'un niveau plus faible entraîne le développement de la lignée lymphoïde (DeKoter and Singh, 2000). De la même façon, à l'intérieur de la lignée myéloïde, une forte expression de PU.1 provoque la différenciation en macrophage alors qu'une plus faible expression conduit à la voie granulocytaire (Dahl and Simon, 2003). Ceci est bien sûr combiné au dosage d'autres facteurs de transcription. Il a été mentionné dans l'introduction de ce mémoire qu'il existait un antagonisme entre C/EBP α et PU.1 dans la lignée myéloïde, PU.1 conduisant à la différenciation en macrophage et C/EBP α , aux granulocytes. Il existe un antagonisme semblable entre PU.1 et GATA-1, un régulateur clé de l'érythropoïèse (Zhang et al., 1999; Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 2000). Un gradient de

facteurs de transcription donnés conduirait donc à un destin cellulaire différent. Cette vision s'inscrit au cœur du modèle stochastique de différenciation cellulaire.

Les résultats présentés ici ainsi que d'autres montrent que des facteurs extrinsèques, les facteurs de croissance, peuvent réguler l'expression des facteurs de transcription clés et donc, le destin cellulaire. Cette nouvelle possibilité attise la controverse entre les deux modèles de différenciation (stochastique versus inductible). L'un et l'autre sont mutuellement exclusifs : le modèle stochastique exclut la possibilité de régulation par l'environnement alors que le modèle inductible indique qu'il s'agit d'un effet tout-ou-rien de l'environnement. Les évidences récentes montrent la nécessité d'un nouveau modèle de différenciation qui tient compte autant des facteurs intrinsèques qu'extrinsèques, et qui tient compte également des mécanismes combinatoires tels que l'antagonisme ou la synergie entre différents facteurs. Les résultats montrés ici suggèrent que le destin cellulaire est déterminé par l'action de facteurs de transcription, qui sont eux-mêmes régulés finement par les facteurs de croissance.

Le rôle important des cytokines dans le choix d'une lignée particulière est souligné par les travaux de Iwasaki-Arai et al. (Iwasaki-Arai et al., 2003). En effet, l'expression ectopique du récepteur du GM-CSF dans des précurseurs lymphoïdes (CLP) provoque la conversion de ceux-ci en cellules myéloïdes. Ces dernières présentent des caractéristiques phénotypiques des deux populations, soient les gènes du TCR ou du BCR réarrangés ainsi que de larges granules et l'expression de marqueurs myéloïdes. Les auteurs suggèrent que les signaux engendrés par le GM-CSF pourraient rendre les CLP sensibles au programme de différenciation myéloïde, en remodelant la structure de la chromatine, par exemple. De plus, ils suggèrent que la conversion

d'une lignée à une autre pourrait être reliée à certains types de leucémies, où on observe des phénotypes mixtes. Ces observations supportent une théorie selon laquelle les cytokines pourraient jouer un rôle beaucoup plus actif qu'on ne le croyait jusqu'à maintenant.

Nos résultats montrent que le GM-CSF augmente le niveau d'expression de PU.1 dans les précurseurs myéloïdes (CMP et GMP) et non dans les précurseurs érythroïdes (MEP). Ceci suggère que le GM-CSF pourrait favoriser directement le choix de lignée dans des cellules multipotentes, puisque ces dernières expriment de faibles niveaux de tous les gènes spécifiques à une lignée particulière (par exemple, une cellule souche exprime aussi bien GATA-1 que PU.1) (Hu et al., 1997; Orkin, 2000; Billia et al., 2001). Une cellule multipotente donnée serait donc toujours prête à se différencier selon n'importe quelle lignée. Si la bonne combinaison de facteurs de transcription se forme, ce complexe peut se lier sur une séquence d'ADN appropriée pour enclencher un programme de différenciation. Lors d'une stimulation avec une cytokine (par exemple, le GM-CSF), nous avons vu que le niveau d'expression des facteurs de transcription augmentait. Les cytokines pourraient donc augmenter les chances que la bonne combinaison de facteurs de transcription se forme, en augmentant le nombre de facteurs d'une lignée spécifique par cellule. Ainsi, le GM-CSF pourrait consolider le choix de la lignée myéloïde via PU.1.

En outre, lorsqu'on observe une population de précurseurs isolée à partir de leurs caractéristiques phénotypiques de surface, comme les GMP et les MEP, ceux-ci expriment les marqueurs attendus de leur lignée spécifique. Ainsi, les GMP expriment PU.1, mais pas SCL ou GATA-1 et les MEP expriment GATA-1 et SCL mais pas PU.1. Par contre, lorsqu'on observe une seule cellule à la fois, on remarque qu'occasionnellement, une cellule myéloïde exprime de faibles niveaux

de SCL ou de GATA-1 (Brady et al., 1995; Hoang et al., 1996). Il existe donc plus d'hétérogénéité et de plasticité que prévu. L'expression de gènes érythroïdes dans des cellules myéloïdes pourrait aussi être un vestige du patron d'expression retrouvé chez les précurseurs, dans des cellules qui viennent de se différencier. Comme PU.1 inhibe la fonction de GATA-1 (et vice-versa), l'augmentation de ce dernier par le GM-CSF pourrait consolider la différenciation myéloïde et ce, de plusieurs façons; premièrement, en enclenchant le programme de différenciation et de survie myéloïdes et deuxièmement, en réprimant les autres programmes de différenciation possibles provenant de GATA-1 ou de SCL.

Un tel gène, qui enclenche un programme de différenciation donné et qui réprime les autres, est connu dans la lignée lymphoïde. En effet, le gène Pax-5 permet le développement des lymphocytes B. Les cellules dépourvues de Pax-5 sont bloquées au stade de différenciation pré-B, un stade légèrement plus avancé que le stade pro-B (voir Figure I). *In vitro* et *in vivo*, il a été montré que des cellules Pax-5^{-/-} possèdent des propriétés de cellules souches, c'est-à-dire qu'elles peuvent se renouveler continuellement et sont multipotentes (Rolink et al., 2002). En effet, ces cellules peuvent se greffer en série chez la souris sans perdre leur capacité de repopuler la moelle osseuse. De plus, *in vitro*, ces cellules peuvent se différencier en macrophages, en cellules dendritiques, en ostéoclastes, en granulocytes et en cellules NK, en présence des cytokines appropriées. Spontanément, lorsqu'on enlève l'IL-7, le facteur qui sert à les maintenir en culture, les cellules se différencient en macrophages. Il a été montré par un autre groupe que Pax-5 pouvait réprimer l'expression d'un gène régulé par PU.1, l'IgH, et que cette répression était dépendante de PU.1 (Linderson et al., 2001). Il est donc possible que Pax-5, dans un contexte normal, permette le développement lymphoïde en enclenchant le programme de

différenciation lymphoïde et en réprimant tous les autres, via l'inhibition d'autres facteurs de transcription clés. Ce mécanisme d'activation / inhibition pourrait donc être beaucoup plus généralisé qu'à première vue.

1.3 L'implication des voies de signalisation Jak / STAT et MAPK

Les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent qu'il existe une voie génétique entre le GM-CSF, PU.1 et les gènes anti-apoptotiques Mcl-1 et A1. Nos résultats montrent que PU.1 occupe les promoteurs des gènes anti-apoptotiques et peut ainsi réguler leur transcription. Par contre, le mécanisme expliquant la transmission du signal entre le récepteur du GM-CSF et PU.1 reste inconnu. Comment le GM-CSF peut-il moduler l'expression de PU.1? Le GM-CSF induit-il la transcription de PU.1 ou bien modifie-t-il sa structure protéique de façon à le rendre actif, par phosphorylation par exemple?

Il est connu que le GM-CSF active les voies de signalisation Jak / STAT et MAPK. Il serait donc possible que la protéine STAT, une fois activée, transloque au noyau et active la transcription de PU.1, quoique aucun site de liaison pour cette protéine sur le promoteur de PU.1 n'ait été rapporté. Il est également possible que STAT s'associe avec PU.1 pour transcrire certains gènes cibles de PU.1 de manière efficace. Une collaboration entre PU.1 et STAT-1 a déjà été rapportée sur le promoteur du gène CD40, un gène myéloïde, mais il n'a pas été démontré que ces deux protéines s'associaient physiquement l'une à l'autre (Nguyen and Benveniste, 2000). De plus, un groupe a montré que les voies de signalisation Jak / STAT et PI3K sont importantes pour l'expression de Mcl-1, un gène cible de PU.1, chez les neutrophiles et ce, en réponse au GM-CSF (Epling-Burnette et al., 2001). Une

troisième possibilité pourrait être que PU.1 devienne phosphorylé, par une MAPK par exemple. PU.1 possède plusieurs sites de phosphorylation potentiels, qui pourraient provoquer un changement conformationnel chez PU.1 et permettre l'accessibilité à de nouveaux partenaires transcriptionnels. Par exemple, un groupe a montré que p38MAPK pouvait phosphoryler PU.1 au niveau du domaine PEST. Ce dernier peut alors collaborer avec la protéine CRE-2 et permettre ainsi la transcription de Mcl-1 en réponse à l'IL-3 dans des cellules Ba/F3 (Wang et al., 2003).

Toutes ces hypothèses restent bien sûr à être explorées plus en profondeur afin de s'assurer d'un mécanisme. Chez des patients souffrant de leucémie myéloïde aigue (AML), il a été remarqué que STAT-5 et ERK1/2 sont hyperphosphorylées en réponse au GM-CSF (Irish et al., 2004) et plusieurs groupes suggèrent que ces deux voies de signalisation pourraient jouer un rôle important dans la leucémogénèse (Coffer et al., 2000; Smithgall et al., 2000; Plataniias, 2003), même si une causalité directe reste à être prouvée. D'autres groupes avancent que les protéines STAT sont constitutivement actives dans l'AML (Benekli et al., 2002; Birkenkamp et al., 2001; Turkson and Jove, 2000; Xia et al., 1998). On pourrait alors penser que cette activité constitutive pourrait être responsable de l'augmentation du niveau d'expression de PU.1 remarquée dans les AML, rapportée dans ce mémoire.

2. CONCLUSION

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'environnement et les facteurs intrinsèques sont intimement liés dans le développement hématopoïétique. Nous suggérons également que des facteurs intrinsèques clés, tel que PU.1, peuvent réguler d'une part la

différenciation cellulaire et d'autre part, la survie. Nous proposons enfin que le destin cellulaire repose sur deux principes : premièrement, l'activation du programme de différenciation souhaité et deuxièmement, la répression des autres programmes possibles.

RÉFÉRENCES

- Acehan,D., Jiang,X., Morgan,D.G., Heuser,J.E., Wang,X., and Akey,C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* 9, 423-432.
- Adams,J.M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 17, 2481-2495.
- Akashi,K., Traver,D., Miyamoto,T., and Weissman,I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Anderson,K.L., Perkin,H., Surh,C.D., Venturini,S., Maki,R.A., and Torbett,B.E. (2000). Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 164, 1855-1861.
- Anderson,K.L., Smith,K.A., Perkin,H., Hermanson,G., Anderson,C.G., Jolly,D.J., Maki,R.A., and Torbett,B.E. (1999). PU.1 and the granulocyte- and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* 94, 2310-2318.
- Antonsson,B., Montessuit,S., Lauper,S., Eskes,R., and Martinou,J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 271-278.
- Bagby,G.C., Jr., Dinarello,C.A., Wallace,P., Wagner,C., Hefeneider,S., and McCall,E. (1986). Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest* 78, 1316-1323.

Bartel,F.O., Higuchi,T., and Spyropoulos,D.D. (2000). Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 19, 6443-6454.

Benekli,M., Xia,Z., Donohue,K.A., Ford,L.A., Pixley,L.A., Baer,M.R., Baumann,H., and Wetzler,M. (2002). Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood* 99, 252-257.

Bigas,A., Martin,D.I., and Milner,L.A. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol. Cell Biol.* 18, 2324-2333.

Billia,F., Barbara,M., McEwen,J., Trevisan,M., and Iscove,N.N. (2001). Resolution of pluripotential intermediates in murine hematopoietic differentiation by global complementary DNA amplification from single cells: confirmation of assignments by expression profiling of cytokine receptor transcripts. *Blood* 97, 2257-2268.

Birkenkamp,K.U., Geugien,M., Lemmink,H.H., Kruijer,W., and Vellenga,E. (2001). Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 15, 1923-1931.

Blobel,G.A. and Orkin,S.H. (1996). Estrogen-induced apoptosis by inhibition of the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol. Cell Biol.* 16, 1687-1694.

Brady,G., Billia,F., Knox,J., Hoang,T., Kirsch,I.R., Voura,E.B., Hawley,R.G., Cumming,R., Buchwald,M., Siminovitch,K., Miyamoto,N., Boehmelt,G., and Iscove,N.N. (1995). Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* 5, 909-922.

Brass,A.L., Kehrli,E., Eisenbeis,C.F., Storb,U., and Singh,H. (1996). Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes Dev.* 10, 2335-2347.

Brizzi,M.F., Aronica,M.G., Rosso,A., Bagnara,G.P., Yarden,Y., and Pegoraro,L. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 3562-3567.

Burgess,A.W. and Metcalf,D. (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56, 947-958.

Caceres-Cortes,J., Rajotte,D., Dumouchel,J., Haddad,P., and Hoang,T. (1994). Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 269, 12084-12091.

Caceres-Cortes,J.R., Krosl,G., Tessier,N., Hugo,P., and Hoang,T. (2001). Steel factor sustains SCL expression and the survival of purified CD34+ bone marrow cells in the absence of detectable cell differentiation. *Stem Cells* 19, 59-70.

Campbell,I.K., Novak,U., Cebon,J., Layton,J.E., and Hamilton,J.A. (1991). Human articular cartilage and chondrocytes produce hemopoietic colony-stimulating factors in culture in response to IL-1. *J. Immunol.* 147, 1238-1246.

Cebon,J., Layton,J.E., Maher,D., and Morstyn,G. (1994). Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br. J. Haematol.* 86, 265-274.

Cecchini,M.G., Dominguez,M.G., Mocci,S., Wetterwald,A., Felix,R., Fleisch,H., Chisholm,O., Hofstetter,W., Pollard,J.W., and Stanley,E.R. (1994). Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* 120, 1357-1372.

Celada,A., Borras,F.E., Soler,C., Lloberas,J., Klemsz,M., Van Beveren,C., McKercher,S., and Maki,R.A. (1996). The transcription factor PU.1 is involved in macrophage proliferation. *J. Exp. Med.* 184, 61-69.

Chao,J.R., Wang,J.M., Lee,S.F., Peng,H.W., Lin,Y.H., Chou,C.H., Li,J.C., Huang,H.M., Chou,C.K., Kuo,M.L., Yen,J.J., and Yang-Yen,H.F. (1998). mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol. Cell Biol* 18, 4883-4898.

Coffer,P.J., Koenderman,L., and de Groot,R.P. (2000). The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene* 19, 2511-2522.

Cortes,F. and Labastie,M.C. (2004). [The ontogenesis of the hematopoietic system revisited]. *Morphologie.* 88, 171-175.

Cowling,G.J. and Dexter,T.M. (1994). Apoptosis in the haemopoietic system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 345, 257-263.

Dahl,R. and Simon,M.C. (2003). The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol. Dis.* 31, 229-233.

Dahl,R., Walsh,J.C., Lancki,D., Laslo,P., Iyer,S.R., Singh,H., and Simon,M.C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates

by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* 4, 1029-1036.

DeKoter,R.P. and Singh,H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.

DeKoter,R.P., Walsh,J.C., and Singh,H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J.* 17, 4456-4468.

Doyle,S.E. and Gasson,J.C. (1998). Characterization of the role of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit in the activation of JAK2 and STAT5. *Blood* 92, 867-876.

Dranoff,G., Jaffee,E., Lazenby,A., Golumbek,P., Levitsky,H., Brose,K., Jackson,V., Hamada,H., Pardoll,D., and Mulligan,R.C. (1993). Faccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3539-3543.

Duronio,V., Welham,M.J., Abraham,S., Dryden,P., and Schrader,J.W. (1992). p21ras activation via hemopoietin receptors and c-kit requires tyrosine kinase activity but not tyrosine phosphorylation of p21ras GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1587-1591.

Eder,M., Griffin,J.D., and Ernst,T.J. (1993). The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor is capable of initiating signal transduction in NIH3T3 cells. *EMBO Journal* 12, 1647-56 biblio.

Enari,M., Sakahira,H., Yokoyama,H., Okawa,K., Iwamatsu,A., and Nagata,S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Epling-Burnette,P.K., Zhong,B., Bai,F., Jiang,K., Bailey,R.D., Garcia,R., Jove,R., Djeu,J.Y., Loughran,T.P., Jr., and Wei,S. (2001). Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.* 166, 7486-7495.

Fairbairn,L.J., Cowling,G.J., Reipert,B.M., and Dexter,T.M. (1993). Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* 74, 823-832.

Filonzi,E.L., Zoellner,H., Stanton,H., and Hamilton,J.A. (1993). Cytokine regulation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor production in human arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 99, 241-252.

Fisher,R.C., Lovelock,J.D., and Scott,E.W. (1999). A critical role for PU.1 in homing and long-term engraftment by hematopoietic stem cells in the bone marrow. *Blood* 94, 1283-1290.

Fleischman,R.A. (1993). From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. *Trends in Genetics* 9, 285-290.

Friedman,A.D. (2002). Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 21, 3377-3390.

Garrett-Sinha,L.A., Su,G.H., Rao,S., Kabak,S., Hao,Z., Clark,M.R., and Simon,M.C. (1999). PU.1 and Spi-B are required for normal B cell receptor-mediated signal transduction. *Immunity* 10, 399-408.

Gasson,J.C. (1991). Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony- stimulating factor. [Review]. *Blood* 77, 1131-1145.

- Gearing,D.P., King,J.A., Gough,N.M., and Nicola,N.A. (1989).
Expression cloning of a receptor for human granulocyte- macrophage
colony-stimulating factor. *EMBO J* 8, 3667-3676.
- Goebel,M.K. (1990). The PU.1 transcription factor is the product of the
putative oncogene Spi-1 [comment]. *Cell* 61, 1165-1166.
- Golub,T.R., Slonim,D.K., Tamayo,P., Huard,C., Gaasenbeek,M.,
Mesirov,J.P., Coller,H., Loh,M.L., Downing,J.R., Caligiuri,M.A.,
Bloomfield,C.D., and Lander,E.S. (1999). Molecular classification of
cancer: class discovery and class prediction by gene expression
monitoring. *Science* 286, 531-537.
- Hamilton,J.A. (2002). GM-CSF in inflammation and autoimmunity.
Trends Immunol. 23, 403-408.
- Hamilton,J.A., Whitty,G.A., Royston,A.K., Cebon,J., and Layton,J.E.
(1992). Interleukin-4 suppresses granulocyte colony-stimulating factor
and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in
stimulated human monocytes. *Immunology* 76, 566-571.
- Hayashida,K., Kitamura,T., Gorman,D.M., Arai,K., Yokota,T., and
Miyajima,A. (1990). Molecular cloning of a second subunit of the
receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
(GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor.
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States
of America* 87, 9655-9 biblio.
- Henkel,G.W., McKercher,S.R., Leenen,P.J., and Maki,R.A. (1999).
Commitment to the monocytic lineage occurs in the absence of the
transcription factor PU.1. *Blood* 93, 2849-2858.

Herblot,S., Steff,A.M., Hugo,P., Aplan,P.D., and Hoang,T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat. Immunol.* **1**, 138-144.

Heufler,C., Koch,F., and Schuler,G. (1988). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **167**, 700-705.

Hirose,S., Nishizumi,H., and Sakano,H. (2003). Pub, a novel PU.1 binding protein, regulates the transcriptional activity of PU.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 351-360.

Hoang,T. (2004). The origin of hematopoietic cell type diversity. *Oncogene* **23**, 7188-7198.

Hoang,T., Paradis,E., Brady,G., Billia,F., Nakahara,K., Iscove,N.N., and Kirsch,I.R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* **87**, 102-111.

Hohaus,S., Petrovick,M.S., Voso,M.T., Sun,Z., Zhang,D.E., and Tenen,D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* **15**, 5830-5845.

Hu,M., Krause,D., Greaves,M., Sharkis,S., Dexter,M., Heyworth,C., and Enver,T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* **11**, 774-785.

Ihle,J.N. (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. [Review] [20 refs]. *Cell* **84**, 331-334.

Irish,J.M., Hovland,R., Krutzik,P.O., Perez,O.D., Bruserud,O., Gjertsen,B.T., and Nolan,G.P. (2004). Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell* 118, 217-228.

Iwama,A., Zhang,P., Darlington,G.J., McKercher,S.R., Maki,R., and Tenen,D.G. (1998). Use of RDA analysis of knockout mice to identify myeloid genes regulated in vivo by PU.1 and C/EBPalpha. *Nucleic. Acids. Res.* 26, 3034-3043.

Iwasaki-Arai,J., Iwasaki,H., Miyamoto,T., Watanabe,S., and Akashi,K. (2003). Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. *J Exp. Med.* 197, 1311-1322.

Janiak,F., Leber,B., and Andrews,D.W. (1994). Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 9842-9849.

Just,U., Stocking,C., Spooncer,E., Dexter,T.M., and Ostertag,W. (1991). Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* 64, 1163-1173.

Kappel,A., Schlaeger,T.M., Flamme,I., Orkin,S.H., Risau,W., and Breier,G. (2000). Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* 96, 3078-3085.

King,A.G., Kondo,M., Scherer,D.C., and Weissman,I.L. (2002). Lineage infidelity in myeloid cells with TCR gene rearrangement: a latent developmental potential of proT cells revealed by ectopic cytokine receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4508-4513.

Kirkland,M.A. (2004). A phase space model of hemopoiesis and the concept of stem cell renewal. *Exp. Hematol.* 32, 511-519.

Klemsz,M.J., McKercher,S.R., Celada,A., Van Beveren,C., and Maki,R.A. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene [see comments]. *Cell* 61, 113-124.

Kondo,M., Weissman,I.L., and Akashi,K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.

Kulesa,H., Frampton,J., and Graf,T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev.* 9, 1250-1262.

Lahlil,R., Lecuyer,E., Herblot,S., and Hoang,T. (2004). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol. Cell Biol.* 24, 1439-1452.

Lecuyer,E., Herblot,S., Saint-Denis,M., Martin,R., Begley,C.G., Porcher,C., Orkin,S.H., and Hoang,T. (2002). The SCL-complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100, 2430-2440.

Leizer,T., Cebon,J., Layton,J.E., and Hamilton,J.A. (1990). Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood* 76, 1989-1996.

Lessard,J., Faubert,A., and Sauvageau,G. (2004). Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion. *Oncogene* 23, 7199-7209.

Lia, F., Rajotte, D., Clark, S.C., and Hoang, T. (1996). A dominant negative granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha chain reveals the multimeric structure of the receptor complex. *J. Biol. Chem.* 271, 28287-28293.

Liao, E.C., Trede, N.S., Ransom, D., Zapata, A., Kieran, M., and Zon, L.I. (2002). Non-cell autonomous requirement for the bloodless gene in primitive hematopoiesis of zebrafish. *Development* 129, 649-659.

Linderson, Y., French, N.S., Neurath, M.F., and Pettersson, S. (2001). Context-dependent Pax-5 repression of a PU.1/NF-kappaB regulated reporter gene in B lineage cells. *Gene* 262, 107-114.

Linette, G.P. and Korsmeyer, S.J. (1994). Differentiation and cell death: lessons from the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 6, 809-815.

Lloberas, J., Soler, C., and Celada, A. (1999). The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol. Today* 20, 184-189.

Luchin, A., Suchting, S., Merson, T., Rosol, T.J., Hume, D.A., Cassady, A.I., and Ostrowski, M.C. (2001). Genetic and physical interactions between Microphthalmia transcription factor and PU.1 are necessary for osteoclast gene expression and differentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 36703-36710.

Marecki, S., Riendeau, C.J., Liang, M.D., and Fenton, M.J. (2001). PU.1 and multiple IFN regulatory factor proteins synergize to mediate transcriptional activation of the human IL-1 beta gene. *J. Immunol.* 166, 6829-6838.

Martin, R., Lahlil, R., Damert, A., Miquerol, L., Nagy, A., Keller, G., and Hoang, T. SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development* 131, 693-702. 3-3-2004.

Ref Type: Generic

Matsuguchi,T., Zhao,Y., Lilly,M.B., and Kraft,A.S. (1997). The cytoplasmic domain of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor alpha subunit is essential for both GM-CSF-mediated growth and differentiation. *J Biol Chem* 272, 17450-17459.

McKercher,S.R., Torbett,B.E., Anderson,K.L., Henkel,G.W., Vestal,D.J., Baribault,H., Klemsz,M., Feeney,A.J., Wu,G.E., Paige,C.J., and Maki,R.A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 15, 5647-5658.

Metcalf,D. (1993). Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?. [Review]. *Blood* 82, 3515-3523.

Miyamoto,T., Iwasaki,H., Reizis,B., Ye,M., Graf,T., Weissman,I.L., and Akashi,K. (2002). Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev. Cell* 3, 137-147.

Moreau-Gachelin,F., Ray,D., Mattei,M.G., Tambourin,P., and Tavitian,A. (1989). The putative oncogene Spi-1: murine chromosomal localization and transcriptional activation in murine acute erythroleukemias [published erratum appears in *Oncogene* 1990 Jun;5(6):941]. *Oncogene* 4, 1449-1456.

Moreau-Gachelin,F., Tavitian,A., and Tambourin,P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 331, 277-280.

Moreau-Gachelin,F., Wendling,F., Molina,T., Denis,N., Titeux,M., Grimber,G., Briand,P., Vainchenker,W., and Tavitian,A. (1996). Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol. Cell Biol.* 16, 2453-2463.

Mui,A.L., Wakao,H., O'Farrell,A.M., Harada,N., and Miyajima,A. (1995). Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J* 14, 1166-1175.

Nakajima,H. and Ihle,J.N. (2001). Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood* 98, 897-905.

Nerlov,C. and Graf,T. (1998). PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12, 2403-2412.

Nguyen,V.T. and Benveniste,E.N. (2000). Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 23674-23684.

Nijhawan,D., Fang,M., Traer,E., Zhong,Q., Gao,W., Du,F., and Wang,X. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 17, 1475-1486.

Nishinakamura,R., Nakayama,N., Hirabayashi,Y., Inoue,T., Aud,D., McNeil,T., Azuma,S., Yoshida,S., Toyoda,Y., and Arai,K. (1995). Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity.* 2, 211-222.

Orkin,S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1, 57-64.

Pardoll,D.M. (1995). Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 399-415.

Park,L.S., Friend,D., Gillis,S., and Urdal,D.L. (1986). Characterization of the cell surface receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 261, 4177-4183.

Partington,G.A., Fuller,K., Chambers,T.J., and Pondel,M. (2004). Mitf-PU.1 interactions with the tartrate-resistant acid phosphatase gene promoter during osteoclast differentiation. *Bone* 34, 237-245.

Perkel,J.M. and Atchison,M.L. (1998). A two-step mechanism for recruitment of Pip by PU.1. *J. Immunol.* 160, 241-252.

Platanias,L.C. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101, 4667-4679.

Quelle,F.W., Sato,N., Witthuhn,B.A., Inhorn,R.C., Eder,M., Miyajima,A., Griffin,J.D., and Ihle,J.N. (1994). JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol. Cell Biol.* 14, 4335-4341.

Rajotte,D., Haddad,P., Haman,A., Cragoe,E.J., Jr., and Hoang,T. (1992). Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *J Biol Chem* 267, 9980-9987.

Rajotte,D., Sadowski,H.B., Haman,A., Gopalbhai,K., Meloche,S., Liu,L., Krystal,G., and Hoang,T. (1996). Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 88, 2906-2916.

Rechsteiner,M. and Rogers,S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267-271.

Reddy,V.A., Iwama,A., Iotzova,G., Schulz,M., Elsasser,A., Vangala,R.K., Tenen,D.G., Hiddemann,W., and Behre,G. (2002).

Granulocyte inducer C/EBP α inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* 100, 483-490.

Rekhtman,N., Choe,K.S., Matushansky,I., Murray,S., Stopka,T., and Skoultchi,A.I. (2003). PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol. Cell Biol.* 23, 7460-7474.

Rekhtman,N., Radparvar,F., Evans,T., and Skoultchi,A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* 13, 1398-1411.

Reya,T., Morrison,S.J., Clarke,M.F., and Weissman,I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

Rodriguez,J. and Lazebnik,Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13, 3179-3184.

Rodriguez-Cimadevilla,J.C., Beauchemin,V., Villeneuve,L., Letendre,F., Shaw,A., and Hoang,T. (1990). Coordinate secretion of interleukin-1 beta and granulocyte- macrophage colony-stimulating factor by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: role of interleukin-1 as an endogenous inducer. *Blood* 76, 1481-1489.

Rogers,S., Wells,R., and Rechsteiner,M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.

Rolink,A.G., Schaniel,C., Bruno,L., and Melchers,F. (2002). In vitro and in vivo plasticity of Pax5-deficient pre-B I cells. *Immunol. Lett.* 82, 35-40.

Saito,M., Korsmeyer,S.J., and Schlesinger,P.H. (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* 2, 553-555.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118.

Sato, N., Sakamaki, K., Terada, N., Arai, K., and Miyajima, A. (1993). Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common β subunit responsible for different signaling. *EMBO J.* 12, 4181-4189.

Scott, C.L., Hughes, D.A., Cary, D., Nicola, N.A., Begley, C.G., and Robb, L. (1998). Functional analysis of mature hematopoietic cells from mice lacking the β chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood* 92, 4119-4127.

Scott, E.W., Fisher, R.C., Olson, M.C., Kehrli, E.W., Simon, M.C., and Singh, H. (1997). PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*. 6, 437-447.

Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.

Seymour, J.F., Lieschke, G.J., Grail, D., Quilici, C., Hodgson, G., and Dunn, A.R. (1997). Mice lacking both granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF have impaired reproductive capacity, perturbed neonatal granulopoiesis, lung disease, amyloidosis, and reduced long-term survival. *Blood* 90, 3037-3049.

Sheridan, J.W. and Metcalf, D. (1972). Studies on the bone marrow colony stimulating factor (CSF): relation of tissue CSF to serum CSF. *J. Cell Physiol* 80, 129-140.

Shibata,Y., Berclaz,P.Y., Chroneos,Z.C., Yoshida,M., Whitsett,J.A., and Trapnell,B.C. (2001). GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*. **15**, 557-567.

Smith,A., Metcalf,D., and Nicola,N.A. (1997). Cytoplasmic domains of the common beta-chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. *EMBO J* **16**, 451-464.

Smithgall,T.E., Briggs,S.D., Schreiner,S., Lerner,E.C., Cheng,H., and Wilson,M.B. (2000). Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* **19**, 2612-2618.

Socolovsky,M., Fallon,A.E., Wang,S., Brugnara,C., and Lodish,H.F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/- 5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* **98**, 181-191.

Spain,L.M., Guerriero,A., Kunjibettu,S., and Scott,E.W. (1999). T cell development in PU.1-deficient mice. *J. Immunol.* **163**, 2681-2687.

Stanley,E., Lieschke,G.J., Grail,D., Metcalf,D., Hodgson,G., Gall,J.A., Maher,D.W., Cebon,J., Sinickas,V., and Dunn,A.R. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 5592-5596.

Tamura,T., Nagamura-Inoue,T., Shmeltzer,Z., Kuwata,T., and Ozato,K. (2000). ICSP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity*. **13**, 155-165.

Tamura,T., Thotakura,P., Tanaka,T.S., Ko,M.S., and Ozato,K. (2005). Identification of target genes and a unique cis-element regulated by IRF-8 in developing macrophages. *Blood*.

- Tenen,D.G., Hromas,R., Licht,J.D., and Zhang,D.E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. [Review] [455 refs]. *Blood* 90, 489-519.
- Tondravi,M.M., McKercher,S.R., Anderson,K., Erdmann,J.M., Quiroz,M., Maki,R., and Teitelbaum,S.L. (1997). Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 386, 81-84.
- Traver,D., Miyamoto,T., Christensen,J., Iwasaki-Arai,J., Akashi,K., and Weissman,I.L. (2001). Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood* 98, 627-635.
- Tremblay,M., Herblot,S., Lecuyer,E., and Hoang,T. (2003). Regulation of pTalpha gene expression by a dosage of E2A, HEB and SCL. *J. Biol. Chem.* ..
- Trevisan,M., Yan,X.Q., and Iscove,N.N. (1996). Cycle initiation and colony formation in culture by murine marrow cells with long-term reconstituting potential in vivo. *Blood* 88, 4149-4158.
- Turkson,J. and Jove,R. (2000). STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19, 6613-6626.
- Wada,H., Noguchi,Y., Marino,M.W., Dunn,A.R., and Old,L.J. (1997). T cell functions in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12557-12561.
- Wang,J.M., Lai,M.Z., and Yang-Yen,H.F. (2003). Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol. Cell Biol.* 23, 1896-1909.
- Weiss,M.J. and Orkin,S.H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9623-9627.

Williams, G.T., Smith, C.A., Spooncer, E., Dexter, T.M., and Taylor, D.R. (1990). Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343, 76-79.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.

Xia, Z., Baer, M.R., Block, A.W., Baumann, H., and Wetzler, M. (1998). Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Res.* 58, 3173-3180.

Xu, Z., Huang, S., Chang, L.S., Agulnick, A.D., and Brandt, S.J. (2003). Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 23, 7585-7599.

Yamashita, Y.M., Jones, D.L., and Fuller, M.T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 301, 1547-1550.

Zhan, Y., Lieschke, G.J., Grail, D., Dunn, A.R., and Cheers, C. (1998). Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood* 91, 863-869.

Zhang, D.E., Zhang, P., Wang, N.D., Hetherington, C.J., Darlington, G.J., and Tenen, D.G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 569-574.

Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-aswapati, N., Radomska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G., and Sun, Z. (1999). Negative

cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 8705-8710.

Zhang,P., Zhang,X., Iwama,A., Yu,C., Smith,K.A., Mueller,B.U., Narravula,S., Torbett,B.E., Orkin,S.H., and Tenen,D.G. (2000). PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* 96, 2641-2648.

Zucali,J.R., Dinarello,C.A., Oblon,D.J., Gross,M.A., Anderson,L., and Weiner,R.S. (1986). Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J. Clin. Invest* 77, 1857-1863.

